

Untersuchung zum Zuckerstoffwechsel der
Wiederauferstehungspflanze *Craterostigma plantagineum*
und einiger Lindernia-Arten

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich- Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Michael Kutzer

aus

Neuss

Bonn 2004

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Inhalt

Abkürzungen	VI
1. Einleitung	1
1.1 Wasser	1
1.2 Stress	2
1.2.1 Trockenstress.....	2
1.2.2 Anpassung von Pflanzen an Wassermangel.....	3
1.2.3 Folgen von Trockenstress.....	5
1.2.4 Antwort von Pflanzen auf extremen Trockenstress	7
1.2.4.1 Veränderte Genexpression bei Trockenstress	7
1.2.4.2 <i>Compatible solutes</i>	9
1.2.4.3 Die „ <i>water replacement</i> “-Hypothese	10
1.2.4.4 Effektivität von Disacchariden als Schutzsubstanzen	11
1.2.5 <i>Craterostigma plantagineum</i>	12
1.2.5.1 Zuckerstoffwechsel von <i>Craterostigma plantagineum</i>	13
1.2.5.2 Transketolasen.....	15
1.2.5.3 Transketolasen aus <i>Craterostigma plantagineum</i>	17
1.3 Zielsetzung der Arbeit.....	19
2 Methoden.....	20
2.1 Material	20
2.1.1 Chemikalien, Radioisotope und Hilfsmittel	20
2.1.2 Regelmäßig benutzte Lösungen und Puffer	20
2.1.3 Pflanzenmaterial.....	21
2.2 Methoden.....	22
2.2.1 Physiologische Methoden	22
2.2.1.1 Ernten und Aufbewahren von Pflanzenmaterial	22
2.2.1.2 Austrocknung von Pflanzen	22
2.2.1.3.1 Wiederbewässerung von Pflanzen	22
2.2.1.3.2 Wiederbewässerungsexperimente mit radioaktiv markierten Sacchariden... 23	
2.2.1.4 Bestimmung des relativen Wassergehaltes von Pflanzenmaterial	23
2.2.1.5 Isolierung von Chloroplasten	24
2.2.2 Methoden zur Untersuchung des Zuckerhaushaltes von Pflanzen.....	25
2.2.2.1 Extraktion und Aufreinigung von Neutralzuckern.....	25

2.2.2.1.1 Extraktion von Neutralzuckern	25
2.2.2.1.2 Aufreinigung von Neutralzuckern.....	25
2.2.2.2.1 Extraktion und Isolierung von Phosphatzuckern	25
2.2.2.2.2 Dephosphorylierung von Phosphatzuckern.....	26
2.2.3 Dünnschichtchromatographie von Sacchariden	27
2.2.4 Dünnschichtchromatographie von Phosphatzuckern	27
2.2.5 HPLC.....	27
2.2.6 Gaschromatographie.....	28
2.2.6.1 Probenvorbereitung	28
2.2.6.2 Gaschromatographische Identifizierung und Quantifizierung von Sacchariden	28
2.2.7 Detektion von ¹⁴ C-markierten Substanzen	29
2.2.8 Enzymologische Untersuchungen	30
2.2.8.1 Transketolase aus <i>Craterostigma plantagineum</i>	30
2.2.8.1.1 Präparation eines nativen Enzymrohextraktes	30
2.2.8.1.2 Ammoniumsulfatfällung	30
2.2.8.1.3 DEAE-Säulenchromatographie	31
2.2.8.1.4 Mono-Q-Säulenchromatographie.....	31
2.2.8.2 Proteinbestimmung nach Bradford.....	31
2.2.8.3 Gelelektrophoretische Untersuchungen	32
2.2.8.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	32
2.2.8.3.2 2D-PAGE	32
2.2.9 Immunodetektion der Transketolase aus Proteinlösungen.....	33
2.2.9.1 Elektrotransfer auf Nitrozellulose (Westernblot).....	33
2.2.9.2 Immunodetektion von Transketolase im Westernblot.....	33
2.2.10 Anfärben von Proteinen in Polyacrylamidgelen	34
2.2.10.1 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen.....	34
2.2.10.2 Coomassie Färbung von Polyacrylamidgelen	34
2.2.11 Enzymassays	34
2.2.11.1 Transketolase-Enzymassay	34
2.2.11.2 Aldolase-Enzymassay	35
2.2.11.3 Enzymatische Bestimmung von β -Hydroxypyruvat	36
2.2.11.4 Substratspezifität von Transketolase	36
2.2.11.4.1 Donorsubstrat	36

2.2.11.4.2 Akzeptorsubstrate	37
2.2.11.4.3 Inhibition von Transketolase	37
2.2.12 MALDI TOF-MS-Untersuchungen.....	38
2.2.12.1 Entfärbung von Proteinspots aus 2D-PAGE	38
2.2.12.2 Verdau von Protein durch Trypsin	38
2.2.12.3 Entsalzen der Proben mit Zip Tip- μ C18	38
2.2.12.4 MALDI TOF-MS-Analysen.....	38
2.2.13 Extraktion nicht flüchtiger, organischer Säuren aus <i>Craterostigma plantagineum</i>	39
3. Ergebnisse	40
3.1 Isolierung von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose aus <i>Craterostigma plantagineum</i>	40
3.2 Zuckerkomponenten in einigen Arten aus der Familie der afrikanischen Linderniae ...	44
3.2.1 2-D-glycero-D-ido-Oktulose Anteil in Blättern von <i>Craterostigma plantagineum</i> .	44
3.2.2 Zuckerszusammensetzung von <i>Craterostigma plantagineum</i> in unbehandeltem und getrocknetem Zustand	45
3.2.3 Messung von Neutralzuckern in verschiedenen Pflanzen.....	47
3.2.4 Veränderungen im Zuckerhaushalt von <i>Crepidiorhopalon lactibracteatus</i> , <i>Lindernia</i> <i>rotundifolia</i> , <i>Lindernia philcoxii</i> , <i>Lindernia brevidens</i> und <i>Craterostigma plantagineum</i> unter Trockenstress	50
3.2.4.1 <i>Crepidiorhopalon lactibracteatus</i>	50
3.2.4.2 <i>Lindernia rotundifolia</i>	51
3.2.4.3 <i>Lindernia philcoxii</i>	52
3.2.4.4 <i>Lindernia brevidens</i>	53
3.2.4.5 <i>Craterostigma plantagineum</i>	55
3.3 Verfolgung der Metabolisierung von Saccharose und Glukose durch radioaktive Markierung	58
3.3.1 Experimente mit ^{14}C -u-Saccharose	58
3.3.1.1 Verteilung von radioaktiv markierten Substanzen im Blattgewebe.....	58
3.3.1.2 Verteilung der radioaktiv markierten Substanzen im Wurzelgewebe.....	60
3.3.2 Experimente mit ^{14}C -6-Glukose.....	61
3.3.3 Experimente mit ^{14}C -1-Glukose.....	63
3.4 Radioaktivitätsverteilung während der Dehydrierung von <i>Craterostigma plantagineum</i>	66

3.5	Identifizierung von radioaktiven Intermediärprodukten der 2-D-glycero-D-ido-Oktulosesynthese während der Wiederbewässerung von <i>Craterostigma plantagineum</i> ...	67
3.6	Enzymatische Untersuchungen zur Konvertierung von Saccharose in 2-D-glycero-D-ido-Oktulose während der Wiederbewässerung.....	69
3.6.1	Relative Enzymaktivität von Transketolase und Aldolase aus <i>Craterostigma plantagineum</i> während der Wiederbewässerung.....	69
3.6.2	Aufreinigung von Transketolase aus <i>Craterostigma plantagineum</i>	69
3.6.3	K _M -Werte für Standardsubstrate von Transketolase	73
3.6.4	pH-Abhängigkeit der Transketolaseaktivität	75
3.6.5	Temperaturstabilität von Transketolase	75
3.6.6	Subzelluläre Lokalisation von Transketolase in Blättern.....	76
3.6.7	Substratspezifität von Transketolase	77
3.6.7.1.1	Donorsubstrate für Transketolase.....	77
3.6.7.1.2	Ausbeuteoptimierung mit β -Hydroxypyruvat als Donorsubstrat.....	78
3.6.7.2	Akzeptorsubstrate für Transketolase	79
3.6.7.2.1	Ribose-5-P	79
3.6.7.2.2	UDP-Glukose	80
3.6.7.2.3	Glukose.....	80
3.6.7.2.4	Glukose-6-P.....	80
3.6.8	Inhibierung von Transketolase durch Glukose-6-P.....	83
3.6.9	Identifizierung der subzellulären Lokalisation der Transketolaseaktivität für das Akzeptorsubstrat Glukose-6-P	85
3.7	Identifizierung von Isoformen der Transketolase	87
3.8	Vorkommen von β -Hydroxypyruvat in <i>Craterostigma plantagineum</i>	88
4	Diskussion	90
4.1	Eintrocknungs- und Wiederbewässerungsexperimente mit <i>Craterostigma plantagineum</i> , einiger <i>Lindernia</i> -Arten und <i>Crepidiorhopalon lactibracteatus</i>	90
4.2	Untersuchungen zum Zuckerstoffwechsel von <i>Craterostigma plantagineum</i>	94
4.3	2-D-glycero-D-ido-Oktulose.....	97
4.4	Untersuchungen zum Syntheseweg von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose in <i>Craterostigma plantagineum</i> während der Wiederbewässerungsphase	99
4.5	Proteinchemische Untersuchungen aufgereinigter Transketolase aus unbehandeltem und wiederbewässertem Blattgewebe von <i>Craterostigma plantagineum</i>	104

4.6 Akzeptorsubstratspezifität von Transketolase aus unbehandeltem und wiederbewässertem Blattgewebe von <i>Craterostigma plantagineum</i>	108
4.7 Isoformen von Transketolase aus <i>Craterostigma plantagineum</i>	110
4.8 Subzelluläre Lokalisation von Transketolaseaktivität.....	111
5 Zusammenfassung	115
6 Literatur	117
Danksagung	130

Abkürzungen

% (v/v)	Volumenprozent	KHCO ₃	Kaliumhydrogencarbonat
% (w/v)	Gewichtsprozent	K _M	Michaelis-Menten-Konstante
¹⁴ C-1-Glukose	an C1 markierte Glukose	KOH	Kaliumhydroxid
¹⁴ C-6-Glukose	an C6 markierte Glukose	MeOH	Methanol
¹⁴ C-u-Glukose	universal markierte Glukose	MgCl ₂	Magnesiumchlorid
¹⁴ C-u-Saccharose	universal markierte Saccharose	Na ₂ S ₂ O ₃	Natriumthiosulfat als Pentahydrat
ACN	Acetonitril	NaAc	Natriumacetat
AgNO ₃	Silbernitrat	NaCl	Natriumchlorid
APS	Ammoniumpersulfat	Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
Ara-5-P	Arabinose-5-P	NaOH	Natronlauge
AS	Ammoniumsulfat	NH ₃	Ammoniak
BSA	Rinderserumalbumin	Oct	2-D-glycero-D-ido-Oktulose
CHCl ₃	Chloroform	Oct-8-P	2-D-glycero-D-ido-Oktulose-8-P
Ci	Curie	-P	Phosphat
CO ₂	Kohlendioxid	PAD	pulsed amperometric detection
Cpm	counts per minute	PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
DC	Dünnschichtchromatographie	PBA	Phenylboronsäure
DEAE-	Diethylaminoethyl-	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
DTT	1,4 Dithiotreitol	R-5-P	Ribose-5-Phosphat (Li-Salz)
DW	Trockengewicht	Ru-5-P	Ribulose-5-Phosphat (Li-Salz)
EDTA	Dinatrium-ethylendiamintetraacetat	SDS	Sodiumdodecylsulfat
EtOH	Ethanol	Sed-7-P	Sedoheptulose-7-P
FDA	Fluoresceindiacetat	Suc	Saccharose
FID	Flammenionisationsdetektor	TCA	Trichloressigsäure
Fru	Fruktose	TEMED	NNN`N`-Tetramethylethylendiamin
Fru-1,6-P ₂	Fruktose-1,6-Bisphosphat	TFA	Trifluoressigsäure
Fru-6-P	Fruktose-6-P	TKT	Transketolase
FW	Frischgewicht	TMS	N,O-Trimethylsilyltrifluoroacetamid
GC	Gaschromatographie	TPP	Thiaminpyrophosphat
Glc	Glukose	TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
Glc-6-P	Glukose-6-Phosphat (Li-Salz)	TW	Turgeszenzgewicht
Gly-Gly	Glycylglycin	Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
H ₂ O dest.	destilliertes Wasser	U	Units (Einheit der Enzymaktivität)
HCCA	α-cyano-4-hydroxy-Zimtsäure	UDP	Uridindiphosphat
HCl	Salzsäure	V _{max}	Maximalgeschwindigkeit
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N`-2-ethansulfonsäure	Xu-5-P	Xylulose-5-Phosphat (Li-Salz)
HPLC	High performance liquid chromatography	Xyl	Xylitol
kDa	Kilodalton		

1. Einleitung

1.1 Wasser

Die Verfügbarkeit von Wasser stellt eine der elementaren Voraussetzungen dar, um biochemische Prozesse in lebenden Organismen zu ermöglichen. Wasser dient nicht nur als Lösungsmittel und Substrat in biochemischen Reaktionen des Stoffwechsels, sondern es dient auch der Erhaltung und Stabilisierung zellulärer Strukturen und Funktionen von Membranen und Proteinen. Wasser stellt mit einem Anteil von durchschnittlich 90% der Gesamtmasse von lebenden Systemen die bedeutendste Matrixsubstanz und den wichtigsten anorganischen Bestandteil dar und dient der Aufrechterhaltung unterschiedlicher physiologischer Prozesse wie Zellwachstum, Bewegung und Transport (Kramer, 1983; Richter, 1996).

Studien über Ernteerträge von acht der wichtigsten Kulturpflanzen zeigten auf, dass abiotische Faktoren wie extreme Temperaturen, längere Trockenperioden, Salinität oder Überflutungen weltweit jährlich Ernteeinbußen von 50% bis 80% verursachen. Wassermangel ist dabei einer der gravierendsten Faktoren (Buchanan et al., 2002).

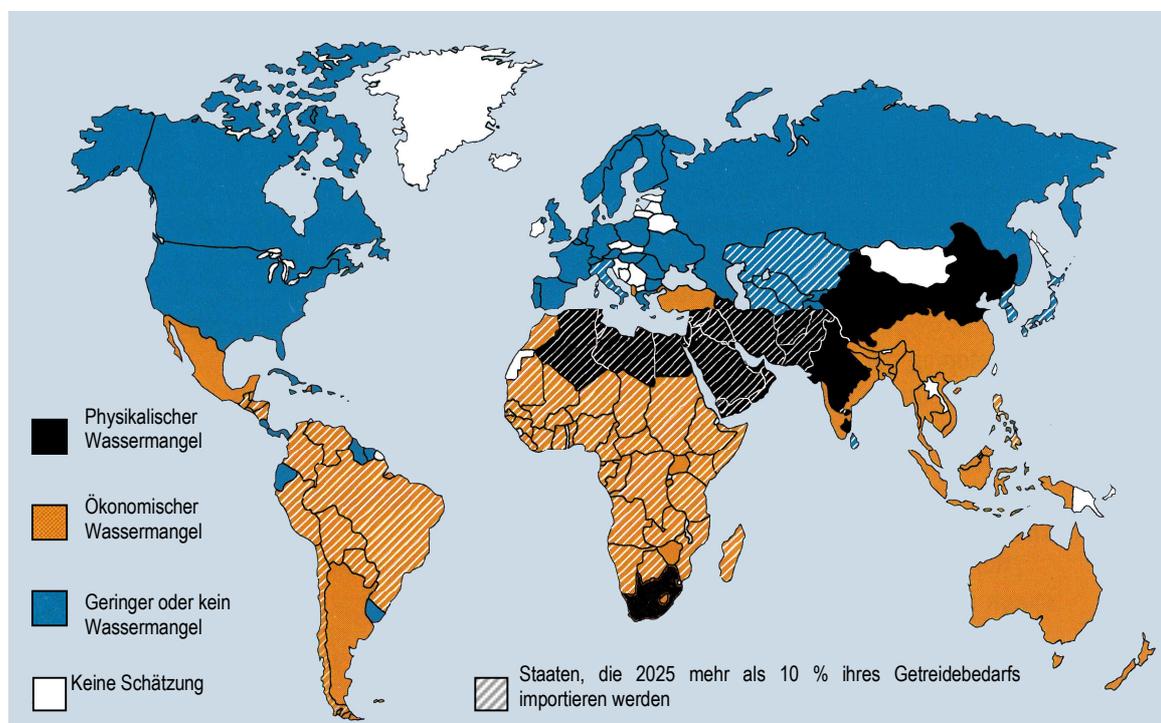


Abb.1-1: Geschätzter Wassermangel weltweit im Jahr 2025 (IWWI, 2002, UNESCO).

Im Zeitraum von 1991 bis 2000 betrug die Zahl der Dürren weltweit 253. Die Tendenz ist steigend (UNESCO, 2003). Auch Staaten in Mittel- und Nordeuropa, denen bisher Dürrekatastrophen in größerem Ausmaß unbekannt waren, erlebten in den letzten Jahren immer häufiger Perioden hoher Temperaturen und Trockenheit. Auch hier ist die Tendenz steigend (Bundesministerium für Umwelt, 2003). Allein der letzte Sommer hat in Deutschland nach Angaben des deutschen Bauernverbandes zu Ernteeinbußen bei Getreide von über 16 % gegenüber einem mehrjährigen Durchschnitt geführt. Teilweise, vor allen im Osten Deutschlands, lagen die Verluste bei über 70 % der Ernte (Deutscher Bauernverband, 2003). Diese Angaben zeigen, dass man sich auch in Länder, die bisher kaum über Wassermangel zu klagen brauchten, auf eine neue Umweltsituation einstellen sollte.

1.2 Stress

Unter Stress (= Anspannungszustand) versteht man die Folgen einer Belastung eines Organismus durch die Einwirkung äußerer Faktoren, die zu einer Beeinträchtigung des Stoffwechsels oder der Entwicklung führen (Schopfer und Brennicke, 1999).

Pflanzen können als sessile Organismen Stressfaktoren nicht aktiv ausweichen. Sie haben darum im Laufe ihrer Entwicklung zahlreiche Schutzmechanismen entwickelt. Allgemein kann man drei Strategien unterscheiden:

- *Toleranz* gegenüber dem Stressfaktor ohne gravierende Schäden zu erleiden,
- *Abwehr* des Stressfaktors durch Schutzmechanismen,
- *Revertierung* der Stressfolgen durch Reparatur der aufgetretenen Schäden.

(Schopfer und Brennicke, 1999)

1.2.1 Trockenstress

Unter Trockenstress (oder auch Wasserstress) versteht man allgemein den Mangel an Wasser. Trockenstress tritt nicht nur beim Austrocknen von Pflanzen durch hohe Temperaturen oder allgemeinem Wasserentzug auf, sondern auch Kälte und hohe Salzkonzentrationen können zum zellulären Wasserverlust führen. Durch Kälte (0°C–15°C) nimmt zum einen die Wasserleitfähigkeit von Wurzelmembranen ab und zum anderen steigt die Viskosität von

Wasser. Bei Temperaturen unter 0°C (Frost) kommt es weiterhin zur Ausbildung von Eiskristallen im Apoplast. Durch die Verringerung des Wasserpotentials wird so dem Symplasten Wasser entzogen: die sogenannte Frostplasmolyse führt zu Trockenstresssymptomen (Schopfer und Brennicke, 1999). Hohe Salzkonzentrationen im Erdreich können ebenfalls Trockenstress induzieren. Durch hohe Salzkonzentrationen wird das Wasserpotential des Erdreichs, das die Wurzeln umgibt, abgesenkt und somit der Pflanze die Wasseraufnahme erschwert (Schopfer und Brennicke, 1999).

1.2.2 Anpassung von Pflanzen an Wassermangel

Aufgrund ihrer Mobilität sind tierische Organismen in der Regel dazu fähig, Wassermangel auszuweichen. Da Pflanzen als sessile Organismen Stresssymptomen nicht ausweichen können, haben sie im Laufe der Evolution verschiedene Strategien entwickelt, um Wasserentzug so gering wie möglich zu halten (Stressvermeidung) bzw. Wassermangel zu tolerieren (Stresstoleranz) (Libbert, 1993). Die pflanzlichen Anpassungen an ihre Umgebung sind dabei sowohl morphologischer als auch physiologischer Natur.

Trockensensible Pflanzen besitzen keine besonderen Schutzvorrichtungen. Ihre Verbreitung ist daher auf Biotope mit einer ständigen Wasserverfügbarkeit begrenzt. Für eine durchschnittliche, mesophytische Pflanze ist schon ein Wasserverlust von mehr als 30 % letal (Schopfer und Brennicke, 1999).

Allgemein werden Pflanzen, die eine an Wassermangel angepasste Anatomie besitzen, als Xerophyten bezeichnet. Morphologische Anpassungen an trockene Standorte sind zum Beispiel bei den Sukkulenten zu beobachten: eine verdickte Kutikula oder aufgelagerte Wachsschichten, Reduktion oder Behaarung der Blattoberfläche und eine Blatt- oder Sprossukkulenz. Diese Anpassungen ermöglichen es Pflanzen, in einzelnen Organen Wasser zu speichern oder durch verminderte Transpiration den Wasserverlust auf ein Minimum zu reduzieren (Richter, 1988).

Beispiele für physiologische Anpassungen xerophytischer Pflanzen sind speziell an wasserarme, stark besonnte und heiße Standorte angepasste Primärstoffwechsel wie die C₄-Photosynthese und der Crassulaceen-Säure-Metabolismus (CAM). C₄- und CAM-Pflanzen haben zwei verschiedene Strategien entwickelt, um ausreichend CO₂ zu akquirieren. Die Gemeinsamkeit beider Stoffwechselwege liegt in der Bildung von Malat als Speicherform des fixierten CO₂. Bei C₄-Pflanzen sind die Systeme zur CO₂-Fixierung und zur Kohlenhydratsynthese in unterschiedlichen Blattgeweben angesiedelt. In CAM-Pflanzen sind beide

Systeme zwar in der gleichen Zelle lokalisiert (wenn auch in unterschiedlichen Kompartimenten), die Kohlenhydratsynthese ist jedoch zeitlich von der CO₂-Fixierung getrennt. Durch die zeitliche Entkopplung von CO₂-Aufnahme und Lichtreaktion kann tagsüber die Verdunstungsrate bei diesen Pflanzenarten um bis zu 90% im Vergleich zu nicht angepassten C₃-Pflanzen minimiert werden (Campbell, 1997). Lediglich nachts öffnen sich die Stomata zur CO₂-Fixierung in Form des stabilen Malats. Tagsüber bleiben die Stomata geschlossen und aus Malat freigesetztes CO₂ wird in den Calvin-Zyklus eingespeist. Der Crassulaceen-Säure-Metabolismus kann durch physiologische Faktoren ausgelöst und gesteuert werden. Ändern sich die Gegebenheiten, können CAM-Pflanzen auch zu einer CO₂-Fixierung am Tag bei geöffneten Stomata übergehen (Richter, 1988). C₄-Pflanzen betreiben die CO₂-Fixierung prinzipiell über Malat. All diese oben aufgeführten Adaptionen erlauben den Pflanzen jedoch nicht, einen vollständigen Wasserentzug zu überleben. Sie besitzen keine echte Trockentoleranz.

Xeromorphe Pflanzen zeigen durch eine Vielzahl von morphologischen Anpassungen, die den Wasserverlust minimieren und die Verfügbarkeit von Wasser erhöhen (kräftiges Wurzelsystem), eine gesteigerte Resistenz gegenüber Trockenheit. Sie meiden die Stresssituation (Avoidance), zeigen jedoch keine echte Toleranz gegenüber Trockenstress (Libbert, 1993; Strasburger 2002).

Die Fähigkeit, einen vollständigen Wasserentzug zu überstehen, findet man in allen Bereichen lebender Organismen. Außerhalb der Pflanzenwelt ist diese Fähigkeit bei vielen Bakterien (Potts, 1999), Pilzen (Mazur, 1968), eukaryotischen Einzellern und höheren eukaryotischen Lebensformen wie einigen Nematodenwürmern (Crowe et al., 1992; Clegg, 2001) anzutreffen. In den meisten höheren Gefäßpflanzen sind in der Regel nur die Samen (Farrant et al., 1993) und Pollen (Hoekstra et al., 1989) trocken tolerant. Nur Pflanzen, die eine Reduktion ihres Wassergehaltes um über 90% durch Austrocknung nicht nur in einem metabolischen Ruhezustand ertragen, sondern bei Verfügbarkeit von Wasser innerhalb kurzer Zeit alle physiologischen Funktionen reaktivieren, gelten als trocken tolerant (Richter, 1996). Die Fähigkeit zum Erlangen von Trockentoleranz ist in diesen Arten nicht nur auf bestimmte Abschnitte der Ontogenese beschränkt, wie sie es bei den meisten anderen höheren Pflanzenarten (Samen- oder Pollenreifung) ist, sondern in allen Geweben und allen Entwicklungsstadien vorhanden. Sie treten in verschiedenen Gruppen der Pflanzenwelt auf (Richter, 1996; Proctor und Pence, 2002). Zu ihnen gehören einige Farnarten (Gaff 1989), Cyanobakterien ((Potts, 1999), Algen (Davis, 1972), Flechten (Kappen und Valladares, 1999) und Moose (Richardson, 1981). Man schätzt, dass es weltweit zwischen 275 und 325

trockentolerante Gefäßpflanzenarten gibt (Porembski und Barthlott, 2000). Eine kleine und systematisch heterogene Gruppe von poikilohydrischen Gefäßpflanzen, die sogenannten Wiederauferstehungspflanzen, sind in der Lage als Ganzes vollständigen Wasserverlust zu überdauern (Gaff, 1971; Gaff, 1977).

1.2.3 Folgen von Trockenstress

Bei Pflanzen, die unter Trockenstress leiden, kommt es zunächst zu einer Schließung der Spaltöffnungen, um den Wasserverlust durch Transpiration zu minimieren. Aufgrund der geschlossenen Stomataöffnungen kommt es so zu einer verminderten Assimilation (Schwab et al., 1989). Im weiteren Verlauf von Trockenstress werden durch Verminderung des Turgordrucks Streckenwachstum, Zellwandsynthese und Zellteilung eingestellt (Reid, 1991; Hsiao, 1973). Fortgesetzter Wasserentzug führt letztendlich bei den meisten Pflanzen zu irreparablen Desorganisationen von Membran- und Organellenstruktur (Crowe et al., 1984; Reid, 1991) und so auch zum Funktionsverlust des Photosyntheseapparates (Schwab et al., 1989).

Während der Dehydrierung einer Zelle kann es zu Membranfusionen und Lipidphasenübergängen kommen, die primär bei der Rehydrierung der Zelle zu Schädigungen führen können (Abb.1-2). Membranen unterschiedlicher Zellkomponenten können sich während der Austrocknung annähern und miteinander fusionieren. Während der Wiederbewässerung ordnen sich die Phospholipide zwar wieder zu doppelschichtigen Membranen an, die Entmischung der Membranstrukturen erfolgt nun jedoch willkürlich. Es kann zum Verschmelzen bisher getrennter Membranstrukturen kommen und dadurch können Zellen neu kompartimentiert oder undicht werden. Beides hat zumeist letale Folgen (Crowe et al., 1987, Crowe et al. 1988, Walters et al., 2002)

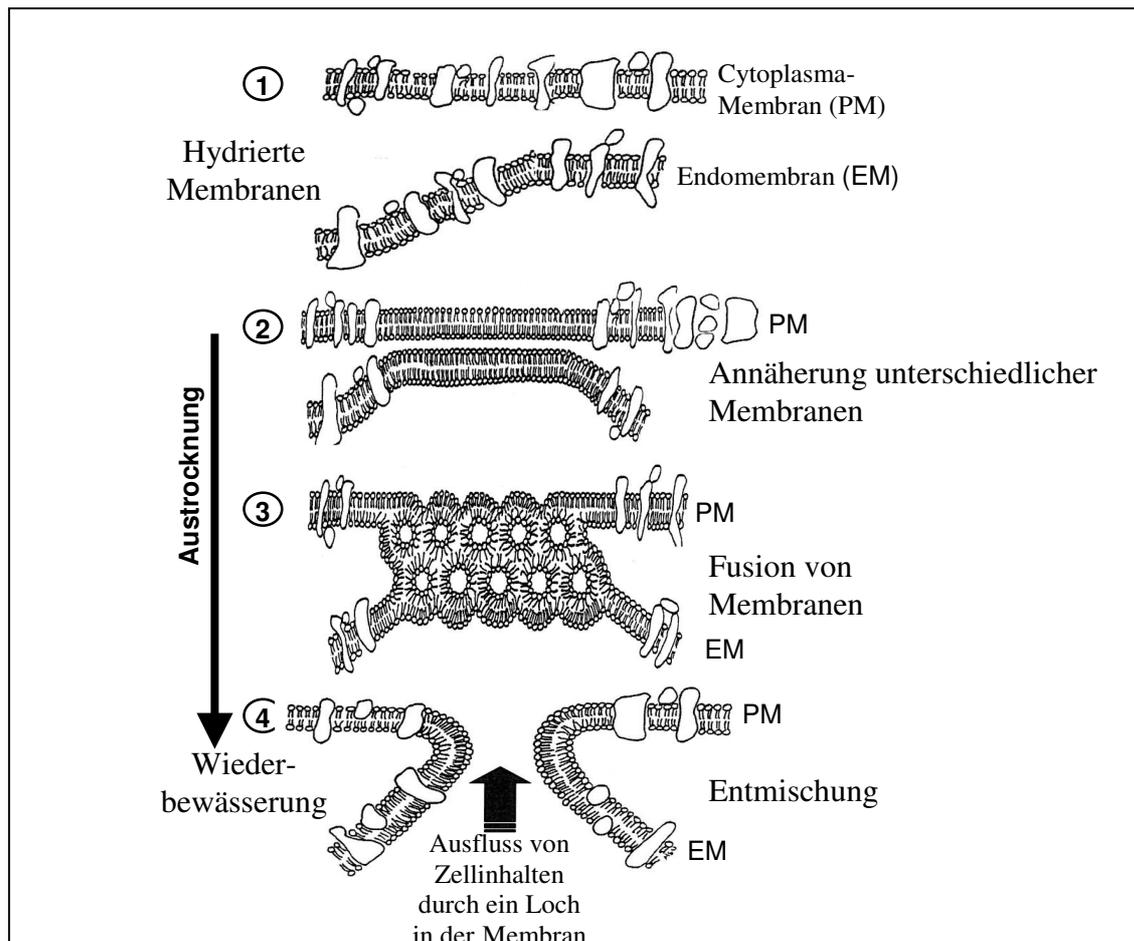


Abb. 1-2: Desorganisation von Membranstrukturen durch Austrocknung: Während der Austrocknung von Zellen nähern sich Membranen an (2) und es kann zu Membranfusionen kommen (3), die während der Wiederbewässerung nicht mehr korrekt aufgelöst werden können (4), so dass es zu neuen, meist letalen Kompartimentierungen kommt (nach Walters et al., 2002).

Neben Membranen können auch Proteine durch Dehydrierung Schädigungen erlangen. Bei vielen Proteinen führt der Verlust ihrer Hydrathülle zu irreversiblen Konformationsänderungen (Leprince et al., 1995). Ein weiterer Angriffspunkt sind Nukleinsäuren. Es konnte gezeigt werden, dass Dehydrierung zu Mutationen, Strangbrüchen und auch Protein-DNA-Quervernetzungen führen kann (Asada et al., 1980; Bieger-Dose et al., 1992).

Letztendlich kann es während der Dehydrierung zu erhöhten Konzentrationen reaktiver Moleküle kommen, die mit anderen Komponenten der Zelle, wie Proteinen oder Nukleinsäuren, reagieren und so zu irreversiblen Zellschädigungen führen (Smirnov, 1993).

1.2.4 Antwort von Pflanzen auf extremen Trockenstress

Aufgrund der vielfältigen durch Austrocknung bedingten Defekte antworten Pflanzen mit einer Vielzahl von Mechanismen, die Schädigungen von Membranen, Proteinen und Nukleinsäuren entgegenwirken sollen. Diese Mechanismen zielen sowohl auf einen Schutz der zellulären Struktur als auch auf die Vermeidung von Wasserentzug der Zellen durch Regulation des osmotischen Druckes ab. In der Regel werden diese Vorgänge in der Pflanze durch eine veränderte Genexpression begleitet (Bray, 1993).

1.2.4.1 Veränderte Genexpression bei Trockenstress

Die ersten Gene, für die eine Induktion durch Wasserdefizit nachgewiesen werden konnte, waren *late embryogenesis abundant*-Gene (LEA-Gene) (Baker et al., 1988). Sie kodieren für Proteine, die normalerweise während der späten Phase der Embryonalentwicklung verstärkt in Samen expremiert werden (Galau und Hughes, 1987). Bereits nach kurzer Zeit fand man heraus, dass viele LEA-Proteine auch in vegetativen Organen als eine Antwort auf Trockenstress expremiert werden (Piatkowski et al., 1990; Cellier et al., 2000; Goyal et al., 2003).

Die Expression von LEA-Genen in Trockenstresssituationen ist nicht nur bei Pflanzen zu beobachten. In Nematoden, wie *Aphelenchus avenae*, konnte ebenfalls die Expression von LEA-ähnlichen Genen in Trockenstresssituationen nachgewiesen werden (Goyal et al., 2003). Allgemein werden LEA-Proteine in fünf Gruppen eingeteilt, die sich von den zuerst charakterisierten LEA-Proteinen aus der Baumwolle ableiten lassen (Baker et al., 1988; Ingram und Bartels, 1996; Phillips et al., 2002a).

Gruppe 1 LEA-Proteine besitzen neben einem konserviertem 20 Aminosäure-Motiv einen hohen Anteil an geladenen und polaren Aminosäureresten, was sie zu einer hohen Wasserbindekapazität befähigt (Dure, 1993a).

LEA-Proteine der Gruppe 2 (Dehydrine), sind ebenfalls hochgradig hydrophil und zeichnen sich durch eine oder mehrere konservierte, lysinreiche Aminosäuresequenzen, auch als K-Segmente (EKKGIMDKIKEKLPG) bezeichnet, aus. Diese K-Segmente sind am C-Terminus lokalisiert und wiederholen sich ein- bis elfmal. Aufgrund ihrer Zusammensetzung nimmt man an, dass sie eine Klasse A amphipatische α -Helix bilden. Zusätzlich zu ihren K-Segmenten hat die Mehrheit der Gruppe 2 LEA-Proteine eine weitere konservierte Region, ein Y-Segment (V/TDE/QYGNP) am N-Terminus (Close, 1997; Soulages et al., 2003). Man

vermutet, dass LEA-Proteine der Gruppe 2 aufgrund ihrer Struktur in der Lage sind, sich bei Eintrocknung an Membranen anzulagern und sie so zu schützen oder durch Interaktion mit exponierten hydrophoben Oberflächen von teilweise denaturierten Proteinen eine Protein-Protein Aggregation zu verhindern (Campbell und Close, 1997).

LEA-Proteine der Gruppe 3 sind durch eine sich mehrfach wiederholendes Aminosäuremotiv aus 11 Aminosäuren (TAE/QAAKE/QKAXE (D7-Familie) oder $\Theta\Theta\Theta$ /QX Θ KE/QK Θ XE/D/Q (D-29 Familie), Θ = AS mit hydrophobem Rest) charakterisiert (Goyal, 2003), die vermutlich amphipathische α -Helices ausbilden (Dure et al., 1989). Es wird angenommen, dass diese Proteine dazu in der Lage sind, Ionen, die während der Eintrocknung der Zelle aufkonzentriert werden, zu binden (Dure, 1993b).

LEA-Proteine der Gruppe 4 zeichnen sich durch einen konservierten N-Terminus aus, von dem man annimmt, dass er ebenfalls eine α -helikale Struktur ausbildet. LEA-Proteine der Gruppe 4 binden an Membranen, was sie zu potentiellen Membranstabilisatoren macht (Dure, 1993a).

LEA-Proteine der ersten vier Gruppen zeichnen sich alle durch eine hohe Hydrophilie und Hitzestabilität aus. So ist es nicht möglich, Proteine der ersten vier Gruppen durch Kochen zu denaturieren. Im Gegensatz dazu sind LEA-Proteine der Gruppe 5 hydrophober und weniger hitzestabil. Man nimmt an, dass sie eine globuläre Struktur besitzen (Ramanjulu und Bartels, 2002; Cuming, 1999).

Es konnte eine positive Korrelation zwischen der Induktion von LEA-Proteinen und Trockenresistenz aufgezeigt werden (Blackman et al., 1995; Tabaei-Aghdai et al., 2000), Versuche mit einer heterologen Expression von LEA-Proteinen in Tabakpflanzen führten zu keiner gesteigerten Trockentoleranz der Pflanzen (Iturriaga et al., 1992). Die Induktion von LEA-Proteinen allein reicht in diesem Fall nicht aus, um Trockentoleranz hervorzurufen.

Eine veränderte Induktion ist nicht nur bei LEA-Proteinen sondern auch bei vielen anderen Proteinen zu beobachten. So treten Veränderungen im Transkriptlevel von Kinasen und Phosphatasen auf, die an der Signaltransduktion beteiligt sind (Munnik et al., 1996, 2000; Wrzaczek und Hirt, 2001; Jonak et al., 2002). Durch Trockenstress wird in einigen Pflanzen auch die Bildung kleiner Hitzeschock-Proteine induziert. Diese kleinen Proteine scheinen eine protektive Wirkung zu besitzen. So wurde gezeigt, dass Hitzeschock-Proteine in Hefen dazu beitragen, Membranen bei Trockenstress zu schützen (Sales et al., 2000). Weiterhin werden Proteinen zur Detoxifikation induziert oder hochreguliert. Von einer Aldehyd-Dehydrogenase aus *C. plantagineum* nimmt man an, dass sie zur Detoxifikation der Zelle beiträgt (Kirch et al., 2001).

Während der Austrocknung von Zellen kann es durch auftretende Schäden an den Elektronentransportketten in den Mitochondrien und Chloroplasten zu erhöhten Konzentrationen von Sauerstoff-Radikalen (ROS = reactive oxygen species) in der Zelle kommen, die diese schädigen (Smirnoff, 1993). Proteine, die an den normalen Abbaureaktionen der Radikale beteiligt sind, Umwandlung der Sauerstoff-Radikale durch eine Superoxid-Dismutase in Wasserstoffperoxid und Sauerstoff, gefolgt von einer Umwandlung des gebildeten H₂O₂ durch Katalasen, Peroxidasen, Gluthathion-Reduktasen und anderen entgiftenden Enzymen, werden als Antwort auf Trockenstress hochreguliert (Ingram and Bartels, 1996). Parallel zu diesen Schutzmaßnahmen vor entstehenden Radikalen wird eine Absenkung dieses Teils des Primärstoffwechsels eingeleitet. In *C. plantagineum* lässt sich bei Wassermangel das Transkript der kleinen Rubisco-Untereinheit nicht mehr nachweisen (Bernacchia et al., 1996). Ein Teil des Photosyntheseapparates wird herunterreguliert.

1.2.4.2 *Compatible solutes*

Durch Trockenstress werden Enzyme induziert, die in den Biosynthesewegen von Schutzsubstanzen wie Prolin, Betain, Citrullin oder Saccharose, sogenannten *compatible solutes*, eine Rolle spielen (Bartels und Nelson, 1994; Kiyosue et al., 1996; Kleines et al., 1999; Yokota et al., 2002; Gao et al. 2004). Neben der Induktion von Enzymen der Biosynthesen von Schutzsubstanzen kann auch eine Herunterregulierung von Enzymen beobachtet werden, die an der Metabolisierung dieser Schutzsubstanzen beteiligt sind. In *Arabidopsis thaliana* wird bei Trockenstress zusätzlich zur Aktivierung der Prolin-Biosynthese das ERD5-Transkript herunterreguliert, dessen Genprodukt am Abbau von Prolin beteiligt ist. Hier wird, neben der Aktivierung der Prolin-Synthese, durch Herunterregulieren eines Enzyms eine Anreicherung einer Schutzsubstanz erreicht (Kiyosue et al., 1996).

In der Regel handelt es sich bei *compatible solutes* um Derivate des Kohlenhydrat- oder Aminosäurestoffwechsels wie Disaccharide (Saccharose, Trehalose), Zuckeralkohole (Glycerol, Sorbitol, Inositol, Mannitol) oder Aminosäuren (Prolin, Glycinbetain). *Compatible solutes* haben eine Reihe gemeinsamer Eigenschaften: sie sind gut wasserlöslich, hydrophil, osmotisch aktiv und auch in hohen Konzentrationen nicht toxisch (Libbert, 1993; Galinski, 1993; Guo et al., 2000). Bei gemäßigttem Wasserstress wirken *compatible solutes* dem Wasserverlust in der Zelle durch eine Erniedrigung des osmotischen Potentials entgegen. Bei fortschreitender Austrocknung der Zellen übernehmen einige dieser Substanzen

möglicherweise die Aufgaben, Proteine und Membranen direkt zu schützen. Phosphofruktokinase, ein Enzym des Kohlenhydratstoffwechsels, wird normalerweise durch Dehydrierung irreversibel inaktiviert (Carpenter et al., 1987a). Bei Anwesenheit von Saccharose, Trehalose oder Maltose während der Dehydrierung bleibt die enzymatische Aktivität hingegen erhalten. Andere Schutzsubstanzen wie Glukose, Glycerol oder Prolin zeigen in diesem Fall jedoch keine Schutzwirkung (Carpenter et al., 1987a, 1987b). Auch der Schutz von Membranen wird zum Teil auf die Anwesenheit der beiden Disaccharide Trehalose und Saccharose zurückgeführt (Crowe et al., 1992). Die „*water replacement*“-Hypothese, die unten näher erläutert werden soll, ist die bisher anerkannteste Theorie zu diesem Thema.

1.2.4.3 Die „*water replacement*“-Hypothese

Membranen befinden sich in ihrer hydratisierten Form in einem flüssig-kristallinen Zustand, in dem die polaren Kopfgruppen der Phospholipide von einer Hydrathülle umgeben sind. Dieser Zustand ermöglicht eine laterale Bewegung der Lipide und integralen Membranproteine. Durch Wasserentzug kommt es zu einer Erhöhung der Packungsdichte der Phospholipide, die Beweglichkeit der Lipide und Membranproteine wird herabgesetzt, und letztendlich kommt es in der Membran zu einem Phasenübergang von der normalen flüssig-kristallinen Phase in eine Gelphase (Crowe et al., 1992).

Wird eine getrocknete, sich in der Gelphase befindende Membran wiederbewässert, kommt es zur erneuten Ausbildung der Hydrathülle um die Kopfgruppen der Phospholipide und zu einem erneuten Phasenübergang zurück in die flüssig-kristalline Phase. Dabei treten jedoch meist Störungen der Membranintegrität durch Fusion, Phasentrennung oder veränderte Wechselwirkungen der Membran mit integralen und peripheren Membranproteinen auf (Crowe et al., 1992).

In Anwesenheit von ausreichenden Mengen Trehalose oder Saccharose werden diese zumeist letalen Effekte nicht beobachtet. Man nimmt an, dass sich die Hydroxylgruppen der nichtreduzierenden Disaccharide an zelluläre Proteine und an die polaren Kopfgruppen der Membranphospholipide anlagern und Wasserstoffbrücken ausbilden. So könnten die Wassermoleküle ersetzt und Abstandsänderungen von Membranmolekülen, Konformationsänderungen und Kristallisation verhindert werden (Crowe et al., 1992). Neben diesen beiden *compatible solutes* wird auch vor allem LEA-Proteinen der Gruppe 1 die Fähigkeit zugesprochen, Wasser zu ersetzen (Dure, 1993a).

Neben der Fähigkeit Wasser zu ersetzen zeigen Saccharide eine weitere wichtige Eigenschaft. Sie können, in Kombination mit anderen *compatible solutes* und LEA-Proteinen, Glasphasen ausbilden (Crowe et al., 1992; Wolkers et al., 2000). Unter einer Glasphase versteht man einen metastabilen Zustand, der einem Feststoff ähnelt, aber die physikalischen Eigenschaften einer hochviskosen Flüssigkeit aufweist. Die Bildung dieser unterkühlten Flüssigkeiten stoppt oder verlangsamt jede chemische Reaktion, die eine molekulare Diffusion erfordert (Franks, 1985).

Die Möglichkeit Glasphasen ausbilden zu können, ist ein Merkmal aller trockentoleranten Gewebe (Buitink et al., 2002). So konnten cytoplasmatische Gläser in getrockneten Samen nachgewiesen werden (Koster, 1991; Bruni und Leopold, 1992). Bei Wasserverlust könnten in trockentoleranten Pflanzen Saccharide und Proteine die Hydrathülle von Zellstrukturen langsam ersetzen und durch das Ausbilden einer Glasphase Zellkomponenten in dieser erstarrten Schmelze in Lösung halten. Dadurch würden Konformationsänderungen von Makromolekülen und Fusionen von Membranen verhindert (Burke, 1986; Prestrelski et al., 1993). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Glasphasen die Stabilität von Enzymen erhöhen können (Chang et al., 1996). Durch die Aufnahme von Wasser können diese hochviskosen Glasphasen jederzeit wieder in einen Zustand geringerer Viskosität überführt werden, und metabolische Reaktionen können wieder starten.

1.2.4.4 Effektivität von Disacchariden als Schutzsubstanzen

Die einzelnen nicht reduzierenden Disaccharide zeigen qualitative Unterschiede in ihrer Fähigkeit, Zellen bei Austrocknung zu schützen. Diese Unterschiede in der Effektivität korrelieren stark mit der Fähigkeit, unter physiologischen Temperaturbedingungen Glasphasen ausbilden zu können (Green und Angell, 1989). Trehalose zeigt bei Untersuchungen zur Stabilisierung von Membranen durch Disaccharide die stärkste Effizienz, gefolgt von Maltose und Saccharose. Trehalose, die in vielen trockentoleranten niederen Pflanzen, Hefen, Bakterien und tierischen Geweben als eine Antwort auf Trockenstress angereichert wird, ist bereits in relativ geringen Konzentrationen von 300 mg Trehalose pro g Membran in der Lage, Membranen bei Dehydrierung erfolgreich zu stabilisieren (Crowe et al., 1984). Saccharose wird hingegen eher in höheren trockentoleranten Pflanzen, von einigen Ausnahmen wie *M. flabellifolius* abgesehen (Drennan et al., 1993), zum Schutz vor Austrocknungsschäden synthetisiert (Kaiser, 1985; Drennan et al., 1993). *In vitro*-Experimente zeigten, dass zur erfolgreichen Stabilisierung von Membranen durch Saccharose,

mindestens ein Saccharose-Phospholipid Mengenverhältnis von 4:1 benötigt wird (Hoekstra et al., 1989). Neben der unterschiedlichen Effektivität der Disaccharide Membranen zu stabilisieren, gibt es einen weiteren wichtigen Unterschied zwischen den beiden am häufigsten als Schutzsubstanzen bei Trockenstress auftretenden Disacchariden. Saccharose neigt, im Gegensatz zu Trehalose, zu Kristallbildung, wodurch einer Glasbildung entgegen gewirkt würde. Die Kristallbildung von Saccharose in trockentoleranten Organismen kann durch Spuren von Oligosacchariden wie Raffinose oder Stachyose jedoch unterbunden werden (Smythe, 1967). Untersuchungen zum Zuckergehalt von trockensensitiven und -toleranten Samen zeigten, dass nicht nur die Anwesenheit ausreichender Mengen Saccharose in den Samen ausschlaggebend für Trockenresistenz ist, sondern wahrscheinlich auch das Verhältnis von Saccharose zu kristallisationshemmenden Oligosacchariden. Trockentolerante Samen wiesen alle ein Verhältnis Oligosaccharide/Saccharose von 0,05 oder größer auf. Bei trockensensitiven Samen lag das Verhältnis unter 0,05 (Lin und Huang, 1994).

Obwohl Saccharose nicht so effektiv wie Trehalose beim Schutz von Zellkompartimenten ist, wird es vielleicht von höheren Pflanzen als Schutzsubstanz synthetisiert. Ein Grund könnte darin liegen, dass Saccharose in diesen Organismen schnell und einfach transportiert und auch wieder metabolisiert werden kann (Bull et al., 1963).

1.2.5 *Craterostigma plantagineum*

C. plantagineum gehört zur Familie der Scrophulariaceae (Rachenblütler). In die Familie der Scrophulariaceae werden unter vielen anderen außer *Craterostigma* auch *Crepidorrhopalon* und *Lindernia* gezählt (Fischer, 1992).

C. plantagineum ist extrem trockentolerant und stammt aus dem südlichen Afrika, ist aber heute auch im östlichen Afrika, Nord-Yemen und Indien zu finden (Fischer, 1992). Die Art besitzt eine große Variabilität. Je nach Standortbedingungen kann die Größe der Pflanzen zwischen Rosetten von lediglich 1 cm langen Blättern, die um die Sprossachse angeordnet sind, bis hin zu Exemplaren mit Blättern von über 10 cm Länge variieren (Fischer, 1992). Die Pflanzen bevölkern felsige Savannenstandorte, besiedeln aber auch beweidete Flächen bis hin zur Trittvegetation. Um in ihren zumeist ariden Lebensräumen überleben zu können, hat *C. plantagineum* eine ausgeprägte Trockenresistenz entwickelt. In Dürreperioden kann der relative Wassergehalt der Pflanze unter 1% sinken (Bartels et al., 1990). In diesem ausgetrockneten Zustand überdauert die Pflanze. Sobald Wasser verfügbar ist, erreicht die Pflanze innerhalb von 20 bis 30 Stunden wieder volle Turgeszenz (Gaff, 1971). Das Wasser

muss jedoch über die ganze Pflanze aufgenommen werden. Der Wassertransport über das Wurzelsystem allein reicht nicht aus. Meist überleben nicht alle Blätter die Trockenperiode, und es sterben einzelne ältere Blätter ab (Gaff, 1977). Mit der Aufnahme von Wasser ist auch eine Reaktivierung der Stoffwechselprozesse verbunden (Schwab et al., 1989).

C. plantagineum eignet sich gut als Modellorganismus zur Untersuchung von Trockentoleranz, da neben den vegetativen Pflanzen auch sterile Kallus-Kulturen zur Verfügung stehen, die nach Behandlung mit Abscisinsäure (ABA) ebenfalls Trockentoleranz aufweisen (Chandler et al., 1997). Abscisinsäure ist ein Phytohormon, das im Signaltransduktionsweg zur Expression trockenstressabhängiger Gene eine Rolle spielt.

Neben physiologischen Studien (Schwab et al., 1986; Schwall et al., 1996) wurden mit *C. plantagineum* zahlreiche molekularbiologische Untersuchungen zur De- und Rehydrierung der Pflanze durchgeführt. Veränderungen in der Genexpression während der De- bzw. Rehydrierung von *C. plantagineum* sorgen für Synthesen einer Vielzahl von Proteinen und Enzymen, die in der Signaltransduktion und Transkriptionskontrolle eine Rolle spielen (Frank et al. 1998; Frank et al., 2000; Bartels und Salamini, 2001; Hilbricht et al., 2002; Deng et al., 2002), die als potentielle Schutzproteine fungieren (Piatkowski et al., 1990; Bartels et al. 1992; Kirch et al., 2001; Ramanjulu und Bartels, 2002; Phillips et al., 2002b) oder am Zuckerstoffwechsel der Pflanze beteiligt sind (Velasco et al., 1994; Bernacchia et al., 1995 und 1996; Ingram et al. 1997; Kleines et al., 1999).

1.2.5.1 Zuckerstoffwechsel von *Craterostigma plantagineum*

C. plantagineum besitzt einen ungewöhnlichen Zuckerstoffwechsel während der De- bzw. Rehydrierung (Bianchi et al., 1991, 1992). In unbehandelten Blättern der Pflanze findet man in großen Mengen eine Ketose, die als 2-D-glycero-D-ido-Oktulose identifiziert wurde (Abb.1-3) (Howarth et al., 1996). Die 2-Ketose verdankt ihren Namen der Konfiguration ihrer C7-Position, die der von D-Glyceraldehyd entspricht, und der Konfiguration an ihrer C3- bis C6-Position, wie man sie bei der Pentose D-Idose findet. NMR und GC/MS-Untersuchungen zeigten, dass 2-D-glycero-D-ido-Oktulose sowohl in ihrer Pyranose- als auch in ihrer Furanoseform vorliegt. Von beiden Ringstrukturen konnte die α - und β -Form identifiziert werden (Irvine et al., 1992).

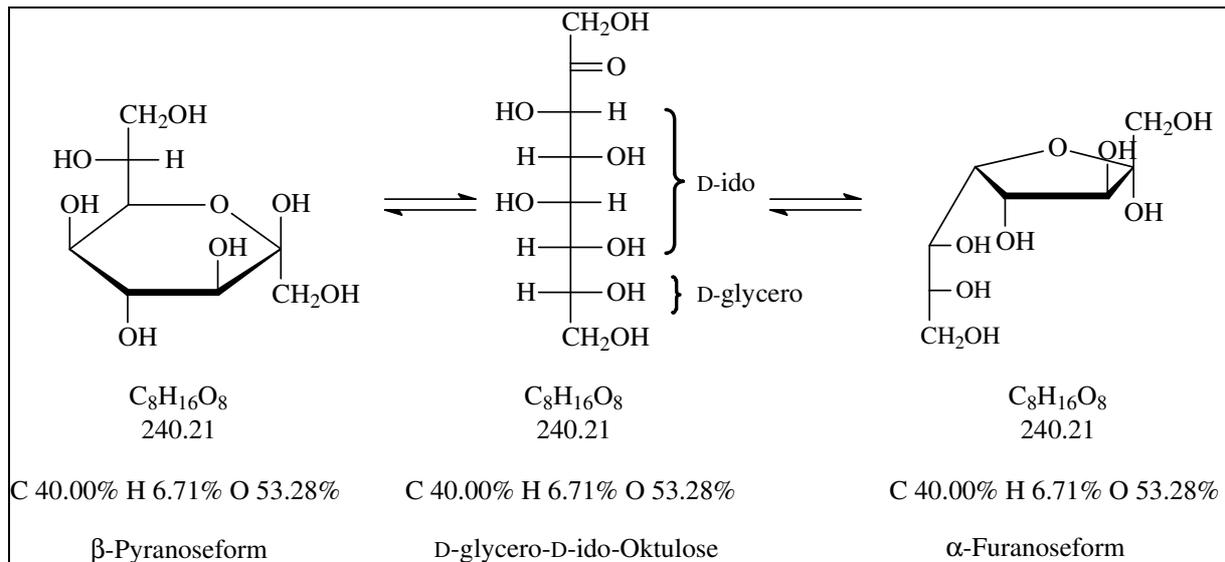


Abb. 1-3: 2-D-glycero-D-ido-Oktulose in der offenen Form, der Pyranose- und der Furanoseform (Howarth et al., 1996).

Das Monosaccharid macht über 40% des Trockengewichtes der Blätter der Pflanzen und über 90% der löslichen Gesamtzuckerfraktion aus (Bianchi et al., 1991). In ausgetrockneten Blättern findet man eine der 2-D-glycero-D-ido-Oktulose-Menge fast äquivalente Menge an Saccharose, jedoch kaum noch 2-D-glycero-D-ido-Oktulose. Saccharose aus ausgetrockneten Blättern von *C. plantagineum* macht, genau wie 2-D-glycero-D-ido-Oktulose in frischem Blattgewebe, über 90% der Gesamtzuckerfraktion aus.

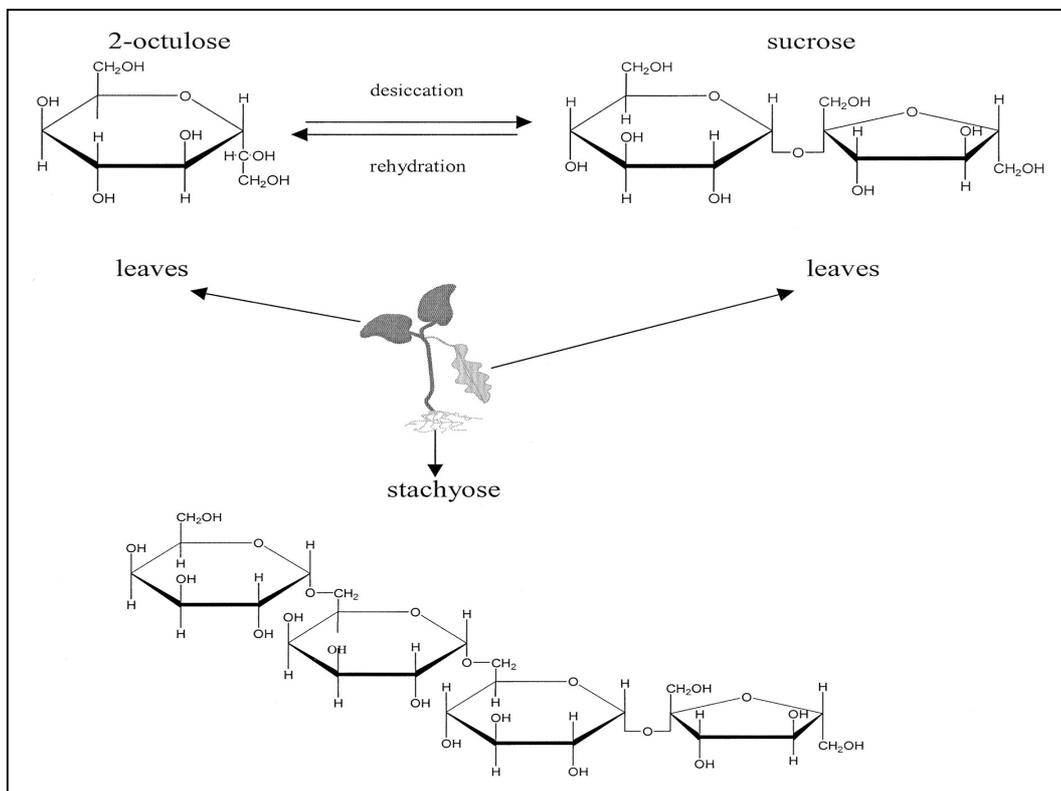


Abb.1-4: Hauptzuckerkomponenten in *C. plantagineum* (Bartels und Salamini, 2001).

Während der Rehydrierung kann wiederum die Metabolisierung von Saccharose bei gleichzeitiger Synthese von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose beobachtet werden. Möglicherweise dient 2-D-glycero-D-ido-Oktulose als eine Speicherform der unter normalen Umständen gut metabolisierbaren Schutzsubstanz Saccharose, die so bei Austrocknung schnell bereitgestellt werden kann.

Im Gegensatz zum Blattgewebe sind im Wurzelgewebe Zucker der Raffinose-Serie die Hauptzuckerkomponenten (Abb. 1-4) (Bartels und Salamini, 2001; Norwood et al., 2003).

Bei Untersuchungen zum Zuckerstoffwechsel der Pflanzen unter Trockenstress konnte die Induktion und die gesteigerte Aktivität von Enzymen nachgewiesen werden, die am Zuckerstoffwechsel beteiligt sind. Neben einer kontinuierlich exprimierten Saccharose-Phosphat-Synthase (SPS) konnte während der Dehydrierung die Expression einer zweiten Saccharose-Phosphat-Synthase belegt werden (Ingram et al., 1997). Saccharose-Phosphat-Synthase dient der Synthese von Saccharose. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Expression von Saccharose-Synthase, die im Gegensatz zu ihrem Namen auch der Spaltung von Saccharose dient, trockenstressabhängig am Ende der Eintrocknungsphase und während der Wiederbewässerungsphase exprimiert wird (Kleines et al., 1999).

Neben diesen für die Synthese bzw. den Abbau von Saccharose verantwortlichen Enzymen wurde auch eine veränderte Genexpression bei zwei für Transketolase [EC2.2.1.1] kodierenden Genen während der Wiederbewässerungsphase beobachtet (Bernacchia et al., 1995).

1.2.5.2 Transketolasen

Transketolasen sind ein Thema der vorliegenden Arbeit. Daher wird im folgenden etwas näher auf diese Enzymklasse im allgemeinen und auf die Eigenschaften der Transketolase aus *C. plantagineum* im besonderen eingegangen.

Transketolase [EC2.2.1.1] gehört zur Klasse der Transferasen. Das Enzym kommt in allen lebenden Organismen vor und katalysiert den reversiblen Transfer einer aktivierten Glykolaldehyd-Einheit von einer aktivierten Ketose (Donorsubstrat) auf eine aktivierte Aldose (Akzeptorsubstrat). Aus dem Donorsubstrat wird dabei eine um 2 C-Atome verkürzte, aktivierte Aldose und aus dem Akzeptorsubstrat eine um 2 C-Atome verlängerte, aktivierte Ketose (Datta und Racker, 1961). Abb. 1-5 zeigt den ersten Transketolaseschritt der reversiblen Verbindung zwischen Pentosephosphatweg und Glykolyse. Weiterhin spielen Transketolasen eine wichtige Rolle im Calvin-Cyclus, der in pflanzlichen Organismen in den

Plastiden lokalisiert ist (Stryer, 1996; Gerhardt et al., 2003). Im Calvin-Cyclus ist Transketolase an der Regeneration von Ribulose-1,5-Bisphosphat, dem CO₂-Akzeptor aus dem ersten Schritt der Dunkelreaktion, beteiligt. In der reversiblen Verbindung zwischen Pentosephosphatweg und Glykolyse dienen Transketolase und Transaldolase der Konvertierung von Ribose-5-Phosphat und Xylulose-5-Phosphat in Fruktose-6-Phosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat und umgekehrt.

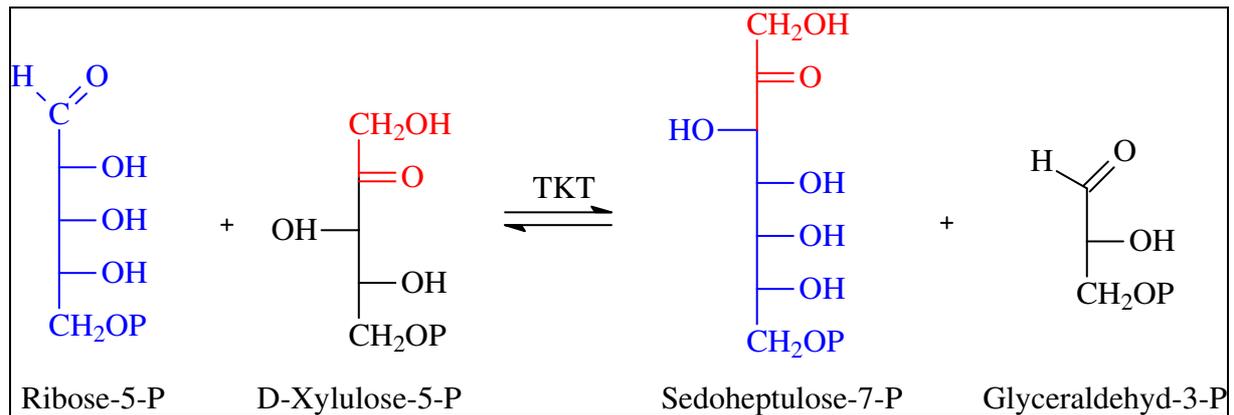


Abb.1-5: Transketolasereaktion aus der reversiblen Verbindung zwischen Pentosephosphatweg und Glykolyse. Die hier gezeigte Reaktion zeigt auch die Standardsubstrate für den Transketolaseaktivitätstest. Es können auch andere aktivierte und nicht aktivierte Aldosen und Ketosen als Substrate verwendet werden.

Transketolase benötigt zweiwertige Kationen, bevorzugt Mg²⁺-Ionen, und Thiaminpyrophosphat (TPP) als Co-Faktor (Lindquist et al., 1992). Der Reaktionsmechanismus der transketolasekatalysierten Übertragungsreaktion ist bekannt und wurde bereits eingehend an Transketolase aus Spinat, Bäckerhefe und *S. cerevisiae* untersucht (Datta und Racker, 1961; Bolte et al., 1987; Kobori et al., 1992; Dalmas und Demuynck, 1993; Fiedler et al., 2001). In einem ersten Schritt wird das Ketosubstrat kovalent an die prostetische Gruppe TPP gebunden und führt zur Bildung eines negativ geladenen, aktivierten Glykolaldehyds als Zwischenprodukt. Die Carbonylgruppe des Akzeptorsubstrats kondensiert anschließend mit der aktivierten Glykolaldehyd-Einheit zu einer neuen Ketose, die vom Enzym freigesetzt wird.

Transketolasen besitzen ein breites Substratspektrum. Sie sind in der Lage, eine große Menge an aktivierten Ketosen wie D-Sedoheptulose-7-P, D-Fruktose-6-P, D-Xylulose-5-P und D-Erythrose-4-P als Donorsubstrate zu akzeptieren. Ein weiteres Substrat, das vor allem in *in vitro*-Synthesen mit Transketolasen verwendet wird, ist β-Hydroxypyruvat. Transketolasen weisen eine hohe Affinität zu Donorketosen mit einer D-*threo*-Konfiguration (C3-L, C4-D), wie sie in D-Xylulose-5-P, D-Fruktose-6-P und D-Sedoheptulose-7-P vorzufinden ist, auf

(Fiedler et al., 2001). Das Akzeptorsubstratspektrum von Transketolasen ist ebenfalls groß und neben D-Glyceraldehyd-3-P, D-Erythrose-4-P, D-Arabinose-5-P, D-Ribose-5-P und D-Glukose-6-P werden auch unphosphorylierte Zucker akzeptiert, wobei die Affinität für diese Zucker sehr gering ist (Datta und Racker, 1961; Bolte et al., 1987; Kobori et al., 1992; Dalmas und Demuynck, 1993, Gerhardt et al., 2003).

Transketolase-Enzyme wurden bereits für viele mikrobielle, tierische und pflanzliche Organismen aufgereinigt und charakterisiert. Alle bisher untersuchten Transketolasen wiesen eine homodimere Struktur auf (Lindqvist et al., 1992; Schwall, 1995; Schneider und Lindqvist, 1998; Svergun et al., 2000; Gerhardt et al., 2003).

Über 30 Transketolase kodierende Gene sind bis heute bekannt. Alle weisen zwei hoch homologe Motive auf. Das erste Motiv ist ein allgemeines Motiv, das TPP abhängige Enzyme beschreibt, das zweite ist spezifisch für Transketolasen (Schenk et al. 1998).

1.2.5.3 Transketolasen aus *Craterostigma plantagineum*

In *C. plantagineum* konnten bisher drei unterschiedliche Gene, die für Transketolasen kodieren, entdeckt werden. Es handelt sich um die Transkripte tkt3, tkt7, und tkt10 (Bernacchia et al., 1995). Das tkt3-Transkript kodiert für eine Transketolase, die in der Pflanze sowohl in Blättern als auch in den Wurzeln unter allen physiologischen Bedingungen kontinuierlich expremiert wird (Abb. 1-6). Die Expression von tkt7 und tkt10 scheint hingegen auf die Periode der Wiederbewässerung eingetrockneter Pflanze beschränkt zu sein. Das tkt7-Transkript wurde sowohl im Wurzelgewebe als auch im Blattgewebe nachgewiesen, das tkt10-Transkript scheint blattspezifisch zu sein. Die aus den Nukleotidsequenzen abgeleiteten Proteinsequenzen weisen untereinander eine Identität von 81-83% und eine Ähnlichkeit von über 90% auf. Im Gegensatz zu den Transkripten tkt7 und tkt10 tritt am 5'-Ende von tkt3 eine ca. 180 bp lange Sequenz auf, die nicht in tkt7 oder tkt10 enthalten ist. Es wird vermutet, dass der Sequenzabschnitt für ein 60 Aminosäure langes Signalpeptid kodiert, das für einen Chloroplastenimport des tkt3-Translationsproduktes benötigt wird (Schwall, 1995). Aminosäuresequenzierungen von Fragmenten aus isolierter, mit Trypsin verdauter Transketolase aus *C. plantagineum* zeigten bisher nur Hinweise auf TKT3. Es konnten auf Proteinebene keine Hinweise auf TKT7 oder TKT10 gefunden werden (Schwall, 1995).

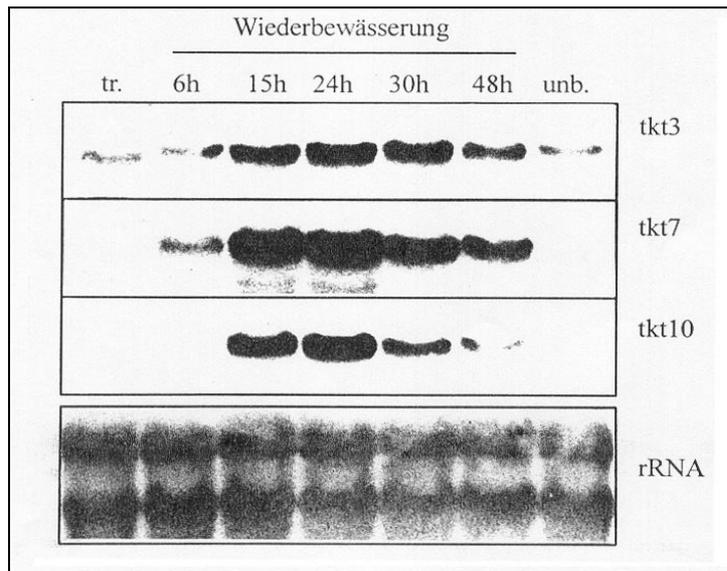


Abb. 1-6: Expression von TKT kodierender RNA aus *C. plantagineum* (Schwall, 1995).

Aufgereinigte Transketolase aus unbehandelten *C. plantagineum*-Pflanzen konnte in zwei Fraktionen von einer Mono-Q-Säule eluiert werden. Die erste Fraktion enthielt eine Bande in einem SDS-PAGE mit einer Größe von 73 kDa, die zweite Fraktion enthielt zwei Banden in einem SDS-PAGE mit Größen von 73 kDa und 75 kDa. Sequenzanalysen ergaben, dass alle Proteine der drei Banden dem Gen *tkt3* zugeordnet werden müssen. Es existieren zwei bis drei verschiedene Gene der *tkt3*-Klasse, wie aus einem genomischen DNA-Blot hervorgeht (Bernacchia et al., 1995). Aus Protein- und Nukleinsäuresequenzdaten kann man ersehen, dass es sich bei den Genprodukten der *tkt3*-Familie wahrscheinlich um kernkodierte, chloroplastische Proteine, die ein N-terminales Signalpeptid für den Chloroplastenimport besitzen, handelt. Durch die Expression unterschiedlicher Allele der *tkt3*-Familie können so die drei unterschiedlichen Banden erklärt werden (Bernacchia, et al., 1995; Schwall, 1995).

Untersuchungen zeigten, dass TKT3 aus *C. plantagineum* eine dimere Struktur besitzt (Schwall 1995). Bei Transketolase aus *C. plantagineum* scheint es sich, wie bei vielen bisher untersuchten Transketolasen aus Hefe, *S. cerevisiae*, Spinat und dem Mensch, um ein Homodimer aus zwei 70 bis 74 kDa großen Untereinheiten zu handeln (Schwall, 1995; Lindqvist et al. 1992; Sprenger et al., 1995; Schenk et al., 1998, Gerhardt et al., 2003).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

C. plantagineum verfügt über einen außergewöhnlichen, an den Austrocknungs- und Wiederbewässerungszyklus der Pflanze gekoppelten Zuckermetabolismus. Wird die Pflanze Trockenstress ausgesetzt, wandelt sie große Mengen einer C8-Ketose, 2-D-glycero-D-ido-Oktulose, in Saccharose um. Die Bildung größerer Mengen Saccharose oder Trehalose bei Trockenstress steht in direktem Zusammenhang mit dem Erwerb von Trockentoleranz. Die Fähigkeit, eine dieser beiden Substanzen zu bilden, ist zwar keine hinreichende Bedingung für Trockentoleranz aber, wie es scheint, eine notwendige. Viele trockenolerante Metabolismen synthetisieren im Fall von länger anhaltendem Wasserverlust große Mengen Saccharose oder Trehalose. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Zuckermetabolismus von *C. plantagineum* und nah verwandter Pflanzenarten unter Trockenstress.

Im allgemeinen ist die Speicherform von Saccharose Stärke. In *C. plantagineum* scheint die Speicherform aus 2-D-glycero-D-ido-Oktulose zu bestehen. Durch *in vivo* ¹⁴C-Markierungsexperimente sollten Aufschlüsse über die Synthesewege von Saccharose und 2-D-glycero-D-ido-Oktulose unter Trockenstressbedingungen erforscht werden. Da zwei Transketolase-transkripte in *C. plantagineum* eine Induktion während der Wiederbewässerungsphase aufweisen, sollte nachgewiesen werden, ob eine oder beide dieser Transketolasegene an der Konvertierung der Schutzsubstanz Saccharose in 2-D-glycero-D-ido-Oktulose beteiligt sind. Transketolase aus *C. plantagineum* sollte näher charakterisiert und mögliche Isoformen identifiziert werden.

2 Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Radioisotope und Hilfsmittel

Verwendete Chemikalien wurden von Merck VWR International (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen), Biorad (München), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Boehringer (Mannheim), Riedel de Haën (München) oder Fluka (München) bezogen. Der Reinheitsgrad der verwendeten Chemikalien war p.A. oder besser.

¹⁴C markierte Glukose und Saccharose wurden von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) bezogen.

Weitere Hilfsmittel wie Röntgenfilm-Entwicklerlösungen, Protein-Assay und Filterpapier stammten von Allmedt (Essen), Bio-Rad (München) und Schleicher & Schüll (Dassel).

2.1.2 Regelmäßig benutzte Lösungen und Puffer

Nährmedium für Sterilkulturanzucht von *C. plantagineum* : 0,8% (w/v) Agarose; 2% (w/v) Saccharose; 0,46% (w/v) MS-Salze (Duchefa, Haarlem, NL); 27 µM Glycin; 4 µM Niacinamid; 2,4 µM Pyridoxin; 0,3 µM Thiamin-Hydrochlorid

Extraktionspuffer: 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 % /w(v) Glycerol; 10 mM MgCl₂; 0,1 mM TPP; 1,5 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon; 5 mM DTT; 1 mM PMSF; 1 mM Benzamidin; 1 mM Benzamid; 1 mM EDTA

Laemmli-Puffer: 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8; 10% (v/v) Glycerol; 70 mM SDS; 0,7 M β-Mercaptoethanol; 0,1% Bromphenolblau

SDS-Laufpuffer: 25 mM Tris-HCl; 19,2 mM Glycin; 3,5 mM SDS

Acrylamid-Trenngellösung: 33% (v/v) Rotiphorese Gel 30 (Roth, Karlsruhe); 375 mM Tris-HCl pH 8,8; 3,5 mM SDS; 0,1% (w/v) APS; 0,04% (v/v) TEMED

Acrylamid-Sammelgellösung: 10,8% (v/v) Rotiphorese Gel 30 (Roth, Karlsruhe); 175 mM Tris-HCl pH 6,8; 3,5 mM SDS; 0,1% (w/v) APS; 0,1% (v/v) TEMED

Rehydrierungspuffer: 8 M Harnstoff; 0,5 % (w/v) CHAPS; 13 mM DTT; 0,5 % (v/v) IPG-Puffer (Amersham, Freiburg); 0,002 % (w/v) Bromphenol blau.

Equilibrierungspuffer: 6 M Harnstoff; 50 mM Tris-HCl (pH 8,8); 70 mM SDS; 30 % (v/v) Glycerin; 0,002 % (w/v) Bromphenol blau.

Xpl-Homogenisierungspuffer: 50 mM HEPES/KOH pH 7,5; 330 mM Sorbitol; 5 μ M Ascorbinsäure; 1 mM MgCl₂; 1 mM MnCl₂; 2 mM EDTA

PBF-Percoll: 15 ml Percoll; 450 mg Polyethylenglykol 4.000; 150 mg BSA; 150 mg Ficoll

Percoll-Gradient:

	80% Percoll	40% Percoll
PBF Percoll	5 ml	8 ml
H ₂ O dest	-	7,6 ml
2 M Sorbitol	1 ml	1 ml
0,5 M EDTA (pH 8,0)	25 μ l	80 μ l
1 M MgCl ₂	8,2 μ l	20 μ l
1 M MnCl ₂	8,2 μ l	20 μ l
1 M Hepes (pH 7,5)	312 μ l	3,3 ml

Western-Blot-Puffer: 25 mM Tris-HCl ; 19,2 mM Glycin ; 20% (v/v) MeOH

TBS-T-Puffer: 20 mM Tris-HCl pH 7,5; 137 mM NaCl; 0,1 % (v/v) Tween 20

Coomassie-Färbelösung: 0,25% (v/v) Coomassie Brilliant Blue R 250; 50% (v/v) MeOH; 7% (v/v) HAc

Entfärber-Lösung: 50% (v/v) MeOH; 7% (v/v)

2.1.3 Pflanzenmaterial

Craterostigma plantagineum: Die ursprünglich in Südafrika gesammelten Pflanzen wurden von Prof. Dr. Volk aus Würzburg zur Verfügung gestellt und anschließend im Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln und im Botanischen Institut der Universität Bonn als Sterilkultur auf MS-Nährmedium, in Erde und in Hydrokultur kultiviert.

Lindernia brevidens, *Lindernia rotundifolia*, *Lindernia philcoxii* und *Crepidiorhophalon lactibracteatus* wurden von Prof. Dr. E. Fischer, Koblenz, gesammelt und im botanischen Garten Bonn auf Erde kultiviert.

Lindernia acicularis, *Lindernia subracemosa*, *Lindernia numerilarifolia* und *Lindernia exilis* wurden freundlicherweise in Silikagel getrockneter Form von Prof. Dr. E. Fischer, Koblenz, zur Verfügung gestellt.

2.2 Methoden

2.2.1 Physiologische Methoden

2.2.1.1 Ernten und Aufbewahren von Pflanzenmaterial

Beim Ernten von frischen Pflanzen wurden die Pflanzen zuerst von Erde, Hydro- oder Sterilkulturmedium befreit und nekrotische Teile der Pflanzen entfernt. Die Pflanzen wurden vorsichtig gewaschen und mit Papiertüchern abgetrocknet. Alle geernteten Pflanzenteile wurden in flüssigen Stickstoff schockgefroren und, falls nicht weiter verarbeitet, bei -80 °C gelagert. Bis zum Einfrieren des Materials wurde zügig gearbeitet und darauf geachtet, dass die Pflanzen nicht austrocknen konnten.

Wurde nur Blattmaterial benötigt, wurden die Blätter vorsichtig von den jeweiligen Pflanzen mit einer Schere entfernt, kurz abgewaschen und schockgefroren.

2.2.1.2 Austrocknung von Pflanzen

Zur Austrocknung wurden stets ganze Pflanzen benutzt. Bei Pflanzen aus Erde oder Hydrokultur wurden lediglich die Übertöpfe mit Wasser entfernt. Pflanzen aus Sterilkulturen wurden dem Medium entnommen, gewaschen und auf feuchtes Filterpapier in Einmachgläsern mit geschlossenen Deckeln gelegt. Nach 24 h wurden zum Austrocknen der Pflanzen die Deckel einen 1 cm weiten Spalt geöffnet.

2.2.1.3.1 Wiederbewässerung von Pflanzen

Zur Wiederbewässerung von Pflanzen wurden diese aus ihren jeweiligen Medien vorsichtig entfernt. Dabei wurde darauf geachtet, die Wurzeln nicht zu beschädigen. Die Pflanzen wurden die ersten 24 h der Wiederbewässerung vollständig unter Wasser belassen. Nach 24 h wurden die Blätter über die Wasseroberfläche gehoben, so dass sich nur noch die Wurzeln unter Wasser befanden.

2.2.1.3.2 Wiederbewässerungsexperimente mit radioaktiv markierten Sacchariden

C. plantagineum-Pflanzen aus einer Sterilkultur (FW zwischen 0,7 und 1,2 g) wurden getrocknet und zur Wiederbewässerung so in einem Reaktionsgefäß mit einem Volumen ^{14}C -markierter Zuckerlösung versetzt, dass die komplette Pflanze gerade unter Wasser stand. Die eingesetzte Menge an ^{14}C -markierten-Substanzen betrug pro Wiederbewässerungsansatz 0,5 mmol. Je nach Größe der Pflanzen wurden zwischen 4 und 6 ml autoklaviertem Leitungswasser benötigt. Experimente wurden mit folgenden markierten Sacchariden durchgeführt:

^{14}C -u-Saccharose:	320-400 mCi/mmol
^{14}C -u-Glukose:	240-360 mCi/mmol
^{14}C -6-Glukose:	50- 60 mCi/mmol
^{14}C -1-Glukose:	50- 60 mCi/mmol

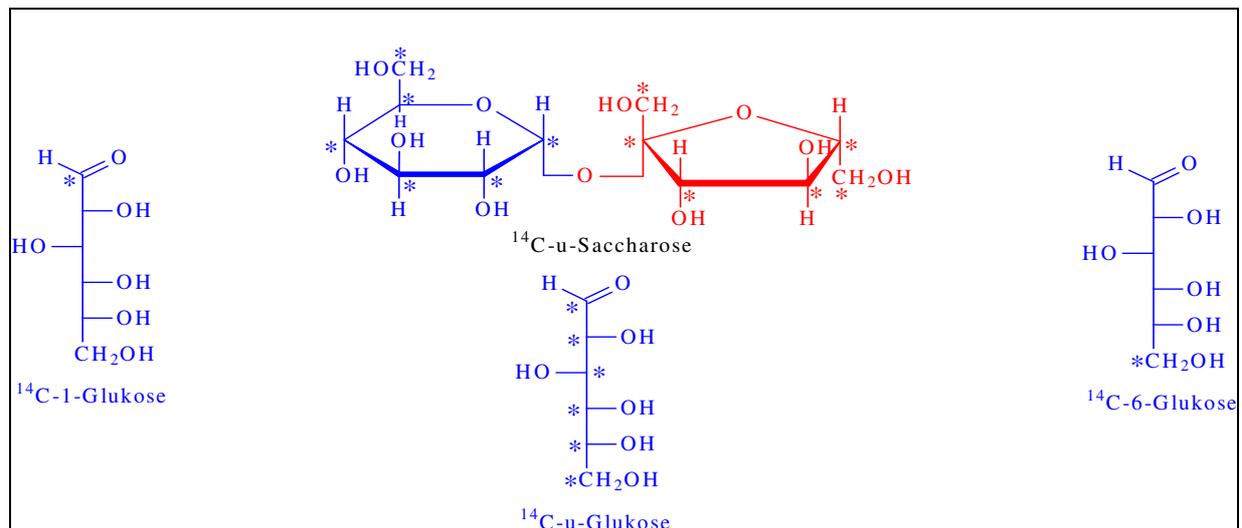


Abb.2-1: Verwendete, radioaktiv markierte Substanzen: * zeigt die radioaktive Markierung.

Nach den ersten 24 h der Wiederbewässerung wurde die jeweilige Zuckerlösung gegen Gießwasser (H_2O dest, 0,1% (v/v) Wuxal, Bayer, Langenfeld) ausgetauscht und die Pflanzen weitere 24 h unter Wasser rehydriert. Danach wurden die Pflanzen mit ihren Blättern über die Wasseroberfläche gehoben, so dass nur noch die Wurzeln unter Wasser standen.

Aus den Blattgeweben und den Wurzelgeweben der Pflanzen wurden zu festgelegten Zeiten Neutralzucker bzw. Phosphatzucker extrahiert.

2.2.1.4 Bestimmung des relativen Wassergehaltes von Pflanzenmaterial

Zur Bestimmung des relativen Wassergehaltes von Blättern wurde ein Blatt der Pflanze entnommen und zur Bestimmung des Frischgewichtes (FW) gewogen. Das Blatt wurde

anschließend für 24 h in einem verschlossenen Behälter auf autoklaviertem Leitungswasser aufschwimmend aufbewahrt, abgetupft und zur Bestimmung des Turgeszenzgewichtes (TW) erneut gewogen. Das Blatt wurde für 48 h bei 80 °C getrocknet und das Trockengewicht (DW) bestimmt. Der relative Wassergehalt errechnet sich wie folgt:

$$\text{RWC (\%)} = \frac{[\text{FW}-\text{DW}]}{(\text{TW}-\text{DW})} \cdot 100$$

2.2.1.5 Isolierung von Chloroplasten

Chloroplasten aus *C. plantagineum* wurden modifiziert nach Bartlett et al. (1982) isoliert. Vor der Isolation wurden die Pflanzen 3 Tage zum Abbau von Stärke im Dunkeln aufbewahrt. Die folgende Isolierung wurde auf Eis bzw. bei 4 °C durchgeführt.

Blätter wurden mit einer Rasierklinge in kleine Stücke geschnitten und in einem Mixer (Ultra Thorax) mit 10 ml eiskaltem Homogenisierungspuffer pro g Pflanzenmaterial versetzt. Nach einer vorsichtigen Homogenisation (viermaliges kurzes Ein- und sofortiges Ausschalten des Mixers bei kleinster Umdrehungszahl) wurde die Lösung über 2 Lagen mit Puffer angefeuchteten Miracloth filtriert. Durch eine folgende Zentrifugation (JA-14-Rotor; 2 min.; 3500 rpm; J2-HS-Zentrifuge, Beckman, München) wurden die Chloroplasten pelletiert. Der Überstand (cytosolische Fraktion) wurde erneut zentrifugiert (JA-14-Rotor; 2 min.; 12.000 rpm; J2-HS-Zentrifuge, Beckman, München).

Das Chloroplastenpellet wurde in einem kleinen Volumen Homogenisierungspuffer resuspendiert, auf einen Percollgradienten aufgetragen und zentrifugiert (Sorvall-Zentrifuge; HS-4; 4°C; 10 min.; 7500 rpm). Der Gradient bestand aus 3 ml einer 80%igen Percoll-Lösung, die mit 9,5 ml einer 40%igen Percoll-Lösung überschichtet wurden. Die Zentrifugation wurde in 25 ml Corex-Glasröhrchen durchgeführt.

Die Chloroplastenfraktion teilte sich in zwei Banden auf. Die untere Bande, gelegen an der Grenzschicht der beiden Percoll-Lösungen, enthielt intakte Chloroplasten. Defekte Chloroplasten schwammen weiterhin auf der Oberfläche der 40%igen Lösung. Die Banden wurden mit einer Pasteurpipette abgezogen, mit Homogenisierungspuffer 1:1 verdünnt und erneut zentrifugiert (Sorvall-Zentrifuge; HS-4; 5 min.; 3500 rpm). Die Pellets wurden in Homogenisierungspuffer resuspendiert. Der Zustand der Chloroplasten wurde mikroskopisch überprüft. Die einzelnen Chloroplastenfraktionen und die cytosolische Fraktion wurden nach einer Proteinextraktion weiteren enzymologischen und chromatographischen Untersuchungen unterzogen.

2.2.2 Methoden zur Untersuchung des Zuckerhaushaltes von Pflanzen

2.2.2.1 Extraktion und Aufreinigung von Neutralzuckern

2.2.2.1.1 Extraktion von Neutralzuckern

Blatt- oder Wurzelgewebe wurde gesäubert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zermörsert. Zucker und andere lösliche Stoffe wurden mit 80%igem MeOH extrahiert (3 ml/g FW). Der Ansatz wurde 5 min. bei 4°C mit 5000 U/min. zentrifugiert (Minifuge T, Heraeus Sepatech). Der Überstand wurde aufbewahrt, das Pellet wurde erneut unter obigen Bedingungen resuspendiert und extrahiert. Die vereinigten Überstände wurden am Rotationsverdampfer bei 25 °C bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in H₂O dest aufgenommen und dreimal gegen Cl₃CH zur Entfernung lipophiler Stoffe ausgeschüttelt. Zur besseren Phasentrennung wurde das Gemisch mit 2000 U/min abzentrifugiert. Nach erfolgter Abtrennung wurde die wässrige Phase 30 min. bei 4°C zentrifugiert (12.000 U/min., JA-14-Rotor, J2-HS-Zentrifuge, Beckman, München). Der Rückstand wurde verworfen (Chlorophyll und andere feine Schwebeteilchen), die wässrige Phase wurde aufbewahrt.

2.2.2.1.2 Aufreinigung von Neutralzuckern

Die wässrige Phase (2.2.2.1.1) wurde zur Entfernung von organischen Säuren, Aminosäuren und anderen geladenen Verbindungen über eine Kationen- und eine Anionenaustauschersäule gegeben (Dowex 50WX8, 200-400 mesh, 10*1 cm; Dowex 1X8, Formiatform, 200-400 mesh, 10*1 cm, Flussrate 1 ml/min.). Die Elution erfolgte mit einem dreifachen Säulenvolumen H₂O dest. Die aufgefangene Lösung wurde am Rotationsverdampfer bei 25 °C bis zur Trockenheit eingengt. Der Rückstand wurde in H₂O dest aufgenommen und auf eine Aktivkohlesäule (Aktivkohle Davco G60/Celite 535 (Verhältnis 1:1) ; Universalkartusche Superformance 26*1 cm; Flussrate 1 ml/min.) zur Entfärbung der Lösung und zur Entfernung von Polysacchariden wie Stachyose und Raffinose gegeben. Die Elution erfolgte mit H₂O dest. Es wurden zunächst 2 ml-Fractionen, später 4 ml-Fractionen gesammelt.

2.2.2.2.1 Extraktion und Isolierung von Phosphatzuckern

Pflanzenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und gemörsert. Das Pulver wurde mit 10%iger (w/v) Trichloressigsäure (TCA) versetzt (1 ml TCA/mg Pflanzenmaterial) und nach einigen Minuten bei 4 °C dekantiert. Anschließend wurde nicht gelöstes

Pflanzenmaterial durch Zentrifugation abgetrennt (12.000 U/min., JA-14-Rotor, J2-HS-Zentrifuge, Beckman, München). Der Rückstand wurde noch zweimal mit 5%iger (w/v) TCA extrahiert. Die vereinten Überstände wurden mit Ether ausgeschüttelt (5 ml Ether/10 ml Extrakt, fünfmal) und die wässrige Phase anschließend über eine Kationentauschersäule gegeben (Dowex 50WX8, 200-400 mesh, H⁺-Form). Die Säule wurde mit drei Säulenvolumen eiskaltem Wasser nachgespült. Das Eluat wurde erneut fünfmal mit Ether ausgeschüttelt. Durch Zugabe von Ammoniak-Lösung wurde der pH-Wert zwischen pH 7 und 8 eingestellt. Zur Entfernung hochmolekularer Stoffe wurde eine Ultrafiltration mit einer Vivaspin 30.000 MWCO PES (VWR, Darmstadt) durchgeführt. Zur Abtrennung von Chlorid, Zuckern, Aminosäuren, Phytin und anderen, störenden Substanzen wurde das Eluat über eine DEAE-Sepharose-Säule (d = 2,6 cm, l = 50 cm) gegeben. Das Material wurde durch wiederholtes Waschen mit 0,1 M Ammoniumtetraborat (pH 8,2-8,4) in seine Borat-Form überführt. Anschließend wurde die Säule mit 1 l destilliertem Wasser nachgewaschen. Der pH-Wert des Eluates mit Phosphatzuckern wurde mit NH₃ auf 8,2-8,4 eingestellt. Zuckerphosphate wurden durch einen linearen Gradienten von 0,05 M bis 0,4 M Ammoniumtetraborat eluiert (1,5 l Gradient, Flussrate: 1 ml/min.). Fraktionen mit Zucker wurden colorimetrisch nach Paoletti (Paoletti et al., 1979) und mit einer Variante der Phosphomolybdat-Färbung detektiert (Wood, 1968):

1g Ammoniummolybdat ((NH₄)₆Mo₇O₂₄*4H₂O) wurde in 8 ml H₂O gelöst und je 3 ml HCl konz. und Perchlorsäure (70%) zugesetzt. 3,5 ml der Lösung wurden zu 22 ml Aceton gegeben. Papier oder Zelluloseplatten mit Phosphatzuckern wurde mit der Lösung angefeuchtet. Nach Verdunsten des Acetons wurde das Papier unter UV-Licht exponiert. Stellen mit Phosphatzuckern färbten sich blau.

2.2.2.2 Dephosphorylierung von Phosphatzuckern

Bis zu 50 µmol Phosphatzucker wurden in 1 ml einer 0,1 M NaAc-Pufferlösung (pH 4,8) mit 1 U saurer Phosphatase (SIGMA, Typ 1, wheat germ) und 15 mM MgCl₂ gegeben und 4 h bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Ansatz für 5 min. auf 100°C erhitzt, zentrifugiert, der Überstand abgenommen und mit KHCO₃ auf pH 6 justiert. Ein gleiches Volumen gemischter Ionentauscher (Dowex 50X8, 100-200 mesh; Dowex 1X8, 100-200 mesh) und 1 ml H₂O dest wurden dem Ansatz zugefügt und ½ h bei Raumtemperatur gerührt. Die Suspension wurde gefiltert und der Rückstand fünfmal mit 0,5 ml H₂O dest gewaschen. Die Eluate wurden vereint und lyophilisiert.

2.2.3 Dünnschichtchromatographie von Sacchariden

Zur Separierung von Neutralzuckern wurden Silikagel 60-Platten (VWR, Darmstadt) verwendet. Als Laufmittel diente n-Butanol:H₂O:n-Propanol (9:1:0,5).

Die Detektion der Sacchariden erfolgte durch Besprühen der Silikagelplatten mit einer Mischung aus EtOH:H₂SO₄:HAc:Anisaldehyd (90:5:1:5) und Erhitzen der Platten auf 100°C für 5 min. Stellen mit Zuckern färben sich dabei grün bis blau.

2.2.4 Dünnschichtchromatographie von Phosphatzuckern

Zur Trennung von Phosphatzuckern wurden cellulosebeschichtete Glasplatten (VWR, Darmstadt) verwendet. Als Laufmittel der ersten Dimension diente ein Gemisch aus n-Butanol : n-Propanol : Aceton : 20% (w/v) Ameisensäure: 30% (w/v) Trichloressigsäure im Verhältnis 40:20:25:25:15, auch als GW 3 bekannt (Wood, 1968). In der zweiten Dimension wurde GW 3 + 2,5 % Phenylboronsäure verwendet (Kapusinski et al.,1985). Die Detektion von Phosphatzuckern erfolgte durch eine Variante der Phosphomolybdat-Färbung (Wood, 1968).

2.2.5 HPLC

Zur Trennung und Identifizierung von Sacchariden und Phosphatzuckern wurde eine CarboPac-PA100-Säule (Dionex, Frankfurt) eingesetzt. Die Programme zur Auftrennung der Zucker erfolgten auf einer HPLC-Anlage (GP-40; Dionex, Frankfurt). Die Detektion erfolgte mittels *pulsed amperometric detection* (ED-40). Das Einspritzvolumen betrug 25 µl.

Programm zur Trennung von Sacchariden:

Flussrate: 1 ml/min.

Elutionsart: isokratisch

Eluent A: H₂O dest (60%)

Eluent B: 1 M NaOH (40%)

Laufzeit: 60 min.

Programm zur Trennung von Phosphatzuckern:

Flussrate: 1 ml/min.

Elutionsart: linearer Gradient

Eluent A: H₂O dest

Eluent B: 1 M NaOH

Eluent C: 1 M NaAc

Laufzeit: 60 min.

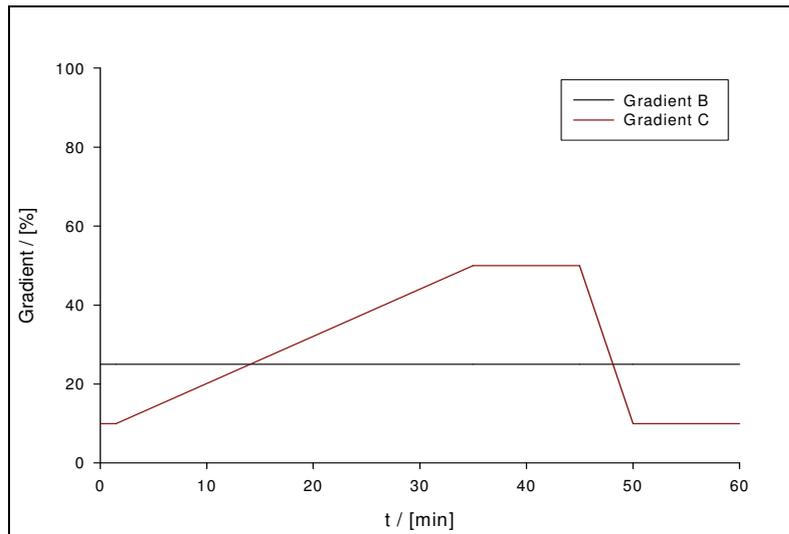


Abb.2-2 : Gradientenprogramm für eine CarboPac-PA100-Säule.

2.2.6 Gaschromatographie

2.2.6.1 Probenvorbereitung

Ein definiertes Volumen wässriger Extrakte (2.3.1.19) wurde im N₂-Strom bei 60 °C getrocknet. Nach Zugabe von 20 µl Pyridin und 20 µl TMS wurde der Ansatz 40 min. bei 60°C inkubiert. Die Trimethylsilylderivate wurden in einem entsprechenden Volumen CHCl₃ aufgenommen und mittels GC/MS bzw. GC/FID analysiert. Es wurde so mit CHCl₃ verdünnt, dass pro Probelauf die Masse der einzelnen zu bestimmenden Komponenten zwischen 1 und 20 ng lag. Als interner Standard diente Xylitol. Pro Probendurchlauf wurde das Derivat-Äquivalent von 5 ng Xylitol aufgetragen

2.2.6.2 Gaschromatographische Identifizierung und Quantifizierung von Sacchariden

Die Auftrennung der Derivate erfolgte auf einer DB1-Säule (l = 30 m, d = 0,32 mm, J&W Scientific, Folsom, USA). Die qualitative Analyse erfolgte mittels kombinierter GC/MS

(Gaschromatograph: 6890 N, Detektor: 5973 MS Detection, HP, Agilent Technologies, Böblingen). Die quantitative Analyse der gemessenen Zuckerderivate wurde mittels GC/FID (5890 Series II Plus, HP, Agilent Technologies, Böblingen) durchgeführt. Folgendes Programm wurde benutzt.:

Injektion Volumen: 1 μ l
Gas: H₂
Constant flow: on
Pressure 37 kPa
Column length: 30 m
Column diameter: 0,32 mm
Initial Temp: 65 °C
Initial time 3,00 min.

Level	Rate (°C/min.)	Temp (°C)	Time (min.)
1	8,00	240	1
2	12,00	310	35

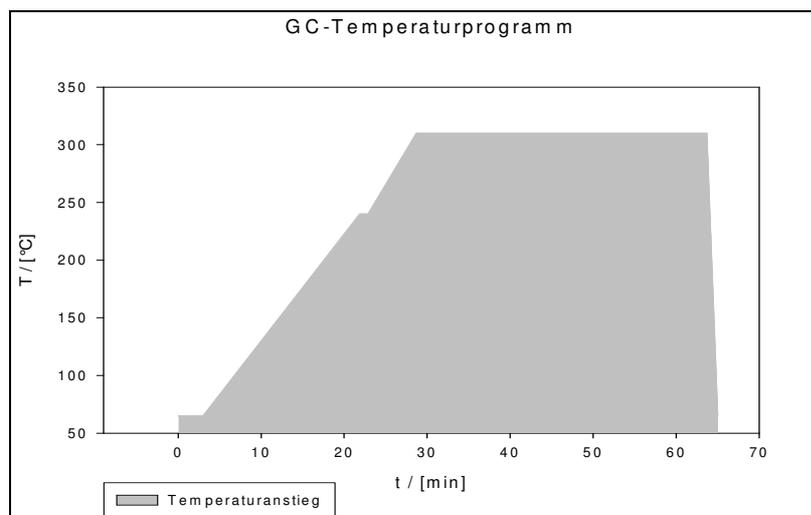


Abb.2-3: GC-Temperaturprogramm bei gleichzeitigem *constant flow*-Modus.

2.2.7 Detektion von ¹⁴C-markierten Substanzen

Extrahierte Neutralzucker aus *C. plantagineum* (2.2.1.3.2) wurden mittels HPLC aufgetrennt. Extrahierte Phosphatzucker aus *C. plantagineum* (2.2.1.3.2) wurden mittels einer DEAE-Sephrose-Säule aufgetrennt. Entsprechende Volumen der Eluate mit radioaktiv markierten Neutralzuckern wurden mit Szintillationslösung versetzt und die Radioaktivität mittels Szintillationszählers (Tri Carb[®] 1600 CA Liquid Szintillation Analyser, Packard, Canberra) ermittelt.

2.2.8 Enzymologische Untersuchungen

2.2.8.1 Transketolase aus *Craterostigma plantagineum*

Die Aufreinigung von Transketolase aus *C. plantagineum* erfolgte nach Schwall (1995) in 4 Schritten: Proteinextraktion, Ammoniumsulfatfällung, DEAE- und Mono-Q-Säulenchromatographie.

2.2.8.1.1 Präparation eines nativen Enzymrohextraktes

Unbehandelte und zunächst getrocknete und dann für 28 h wiederbewässerte *C. plantagineum* Blätter wurden in flüssigem N₂ schockgefroren. Nach Zugabe von 10% (w/w) Quarzsand wurde das Pflanzenmaterial zu einem feinen Pulver zermahlen und mit 3 ml Enzym-Extraktionspuffer pro 1 g Pflanzenmaterial bei 4°C homogenisiert. Der Extrakt wurde über Nylongaze filtriert und unlösliche Partikel durch eine 30 min. Zentrifugation bei 4°C (20.000 U/min., JA-20, J2-HS-Zentrifuge, Beckman, München) pelletiert. Der Überstand wurde einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung unterworfen.

2.2.8.1.2 Ammoniumsulfatfällung

Entsprechende Mengen (NH₄)₂SO₄ wurden zu einem feinen Pulver zermahlen. Unter Rühren wurde der auf 0 °C gekühlten Enzymlösung (NH₄)₂SO₄ bis zum Erreichen der gewünschten (NH₄)₂SO₄-Sättigung in kleinen Portionen zugegeben. Die Zugabe erfolgte über einen Zeitraum von 1 h. Die Lösung wurde eine weitere ½ h gerührt und anschließend wurde präzipitiertes Protein durch Zentrifugation (30 min., 0 °C, 14.000 U/min., JA-20, J2-HS-Zentrifuge, Beckman, München) pelletiert. Der klare Überstand wurde entfernt und bei 0 °C einer weiteren fraktionierten Fällung unterworfen, das entsprechende Pellet wurde in ungefähr seinem dreifachen Volumen Puffer A aufgenommen (50 mM Tris-HCl pH 7,5 (25 °C), 10% (v/v) Glycerol, 10 mM MgCl₂) und erneut zur Abtrennung ungelöster Bestandteile mit 14.000 U/min. zentrifugiert.

Die fraktionierte Ammoniumsulfatfällung erfolgte in folgenden Schritten: 0-20% Sättigung, 20-55% Sättigung, 55-65% Sättigung, 65-75% Sättigung und 75-85% Sättigung. Die Detektion von Transketolase erfolgte durch Aktivitätstests (2.4.6.1) und Immunodetektion (2.4.4) der Transketolase. Fraktionen mit Transketolase wurde für 24 h gegen 200 ml Puffer A pro 1 ml Proteinlösung dialysiert.

2.2.8.1.3 DEAE-Säulenchromatographie

Dialysierte Lösung mit Transketolase wurde bei 4 °C auf eine mit Puffer A äquilibrierte DEAE-Säule (20*2,6 cm, DEAE-Cellulose, Sigma) aufgetragen. Die Säule wurde mit dem vierfachen Säulenvolumen mit Puffer A gewaschen. Die Elution der Transketolase erfolgte mit einem linearen Gradienten von 0-0,5 M NaCl in Puffer A über 5 Säulenvolumen (Flussrate 1 ml/min). Es wurden 10 ml Fraktionen gesammelt. Fraktionen mit Transketolase wurden mittels Immunodetektion identifiziert, vereinigt und das Volumen mittels Ultrafiltration (5000 U/min., JA-20, J2-HS-Zentrifuge, Beckman, München; Vivaspin 30.000 MWCO PES (VWR, Darmstadt)) eingengt. Gleichzeitig erfolgte eine Umpufferung in Puffer B (20 mM Tris-HCl pH 8,1 (25 °C); 10% (v/v) Glycerol; 10 mM MgCl₂).

2.2.8.1.4 Mono-Q-Säulenchromatographie

Das aufkonzentrierte Enzymeluat wurde bei Raumtemperatur auf eine mit Puffer B äquilibrierte FPLC Mono-Q HR 10/10 Säule aufgetragen (Flussrate 1 ml/min). Die Elution der Transketolase erfolgte mit einem linearen Gradienten von 0-0,5 M NaCl über 20 Säulenvolumen (20 ml). Es wurden 0,5 ml-Fraktionen gesammelt. Die Aufreinigung erfolgte auf einer FPLC-Anlage von Pharmacia, Freiburg (FPLC-Pump P-500, Vivicord VW 2251, Frac 200). Fraktionen mit Transketolase wurden vereinigt und mittels Ultrafiltration (5000 U/min., JA-20, J2-HS-Zentrifuge, Beckman, München; Vivaspin 30.000 MWCO PES (VWR, Darmstadt)) aufkonzentriert.

2.2.8.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen in detergenzfreien Lösungen erfolgte nach Bradford (1976) mittels BioRad Proteinassay Kit. BSA diente als Proteinstandard zur Erstellung einer Eichgeraden.

Das Gesamtvolumen des Assays betrug 1ml. 200 µl BioRad Proteinassay Kit, 2-50 µl Proteinextrakt und die entsprechende Menge H₂O dest wurden gemischt und nach 5 min. die Extinktion der Proben bei 595 nm in einem Ultrospec 2000 (Pharmazia, Freiburg) bestimmt.

2.2.8.3 Gelelektrophoretische Untersuchungen

2.2.8.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Nach Bestimmung der Proteinkonzentration eines Extraktes (2.4.2) wurde ein Volumen Extrakt mit einem Volumen SDS-Lämmli-Puffer versetzt und 5 min. bei 100°C inkubiert. Die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte in einem denaturierenden, diskontinuierlichen Gelsystem nach Lämmli (1970). Für die Gelelektrophorese wurden 1 mm dicke Gele mit einem 4%igem Sammel- und einem 10%igem Trenngel eingesetzt. Nach Auftrennung der Proteine in Elektrophoresepuffer wurden die Gele entweder für immunologische Untersuchungen auf Nitrozellulosemembran geblottet oder angefärbt.

2.2.8.3.2 2D-PAGE

Für die Isoelektrofokussierung wurden die Proteinextrakte zunächst zur Entfernung von Salzen und anderen, störenden Substanzen für 24 h gegen H₂O dest dialysiert (zweimal 1000 ml H₂O dest/1 ml Enzymlösung). Nach einer Bestimmung der Proteinkonzentration wurde ein entsprechendes Volumen des Extraktes bis zur Trockene eingengt und das Protein anschließend in 125 µl Rehydrierungspuffer gelöst. Für 7 cm lange IPG-Strips (pH 3-10) (Amersham Bioscience, Freiburg) wurden maximal 100 µg Protein in 125 µl Rehydrierungspuffer verwendet. Die Rehydrierung der IPG-Strips erfolgte über 12 h bei 20 °C in einem ETTAN IPGphor II (Amersham Bioscience, Freiburg). Für die Isoelektrofokussierung wurde folgendes Programm verwendet:

Step und voltage mode	Voltage / [V]	Step duration / [min.]	Volt-hours / [kVh]
1 Step and hold	500	30	0,25
2 Step and Hold	1000	30	0,5
3 Step and hold	5000	100	7,5
Total		160	8,25

Bevor der IPG-Strip nach Beendigung der Isoelektrofokussierung auf ein SDS PAGE aufgetragen wurde, erfolgten drei Equilibrierungsschritte. Der IPG-Strips wurde nacheinander für jeweils 10 min. in 10 ml Equilibrierungspuffer, 10 ml Equilibrierungspuffer + 100 mg DTT und 10 ml Equilibrierungspuffer + 250 mg Iodoacetamid equilibriert.

Anschließend wurde der IPG-Strip mit einer 0,5%igen Agarose-Lösung (0,5% (w/v) Agarose in SDS-Laufpuffer) auf einem SDS-PAGE fixiert. Für die Gelelektrophorese wurden 1 mm dicke Gele mit einem 4%igem Sammel- und einem 10%igem Trenngel eingesetzt.

2.2.9 Immunodetektion der Transketolase aus Proteinlösungen

2.2.9.1 Elektrotransfer auf Nitrozellulose (Westernblot)

Der Transfer der Proteine aus einem Gel auf Nitrozellulosemembran erfolgte in einer Nassblot-Kammer (Satorius, Göttingen). Als Transfer-Puffer wurde eine Lösung aus 39 mM Glycerin, 48 mM Tris-HCl und 20 % (v/v) Methanol verwendet. Es wurde mit 5 mA/cm² Gelfläche für 3 h geblottet. Im Anschluss wurde die Proteinbeladung der Membran mit einer reversiblen Ponceau S Färbung (Salinovich, 1986) kontrolliert.

Zum Transfer von Protein aus nativer Lösung auf Nitrozellulosemembran wurde ein Volumen der Lösung mit einem Volumen Laemmli-Puffer versetzt, 5 min. bei 100 °C inkubiert und in einer Blot-Kammer mittels Wasserstrahlpumpenvakuum direkt auf die Membran aufgetragen.

2.2.9.2 Immunodetektion von Transketolase im Westernblot

Beladene Nitrozellulosemembran wurde zunächst für 1 h mit 5% (w/v) Magermilchpulver in TBS-Puffer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T-Puffer wurde die Membran für 1 h in 3.000fach verdünnten Anti-TKT-Serum (Verdünnung in 5% (w/v) Magermilchpulver in TBS-T-Puffer; Schwall, 1995) bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T-Puffer wurde die Membran für 1 h mit dem sekundären Antikörper (peroxidasegekoppelter Anti-Kaninchen-Immunglobulin G-Antikörper mit einer 10.000fachen Verdünnung in 5% (w/v) Magermilchpulver in TBS-T-Puffer) inkubiert. Es folgte wieder dreimaliges Waschen mit TBS-T-Puffer.

Die Detektion von Transketolase erfolgte mit der Enhanced Chemolumineszenz Methode (ECL, Amersham Bioscience, Freiburg). Zur Detektion des Lumineszenzsignals wurde die Membran auf einem Röntgenfilm (X-Omat, Kodak, Rochester) für 0,5-5 min. exponiert.

2.2.10 Anfärben von Proteinen in Polyacrylamidgelen

2.2.10.1 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen

Ein zu färbendes Gel wurde nach folgendem Protokoll angefärbt:

Vorgang	Lösung	Zeit
Fixierung	50% MeOH, 12% HAc	min. 3 h
Waschen	30% EtOH	>3*30 min.
Imprägnieren	85 μ M Na ₂ S ₂ O ₃ , 0,25 % (v/v) Formaldehyd	1 min.
Waschen	H ₂ O dest	3*1min.
Färben	12 mM AgNO ₃ , 0,025 % (v/v) Formaldehyd	20-60 min.
Waschen	H ₂ O dest	2*30 sec
Reduktion	0,57 M Na ₂ CO ₃ , 0,018 % (v/v) Formaldehyd, 1,25 μ M Na ₂ S ₂ O ₃	10 min.
Stoppen	7 % HAc	2*10 min.
Waschen	dd H ₂ O	2*2 min.
Aufbewahren	30 % MeOH	mehrere Tage
Konservieren	3% Glycerin, 1% MeOH	

2.2.10.2 Coomassie Färbung von Polyacrylamidgelen

Gele wurden in einem „one-step“-Verfahren nach Zehr (1989) mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt. Nach dem Gellauf wurde das Gel für 2 h in Coomassie-Färbelösung gelegt. Anschließend wurde das Gel für einige Stunden mit Entfärbelösung entfärbt. Die Entfärbelösung wurde mehrmals gewechselt.

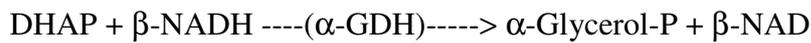
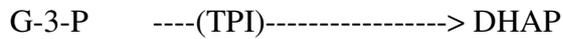
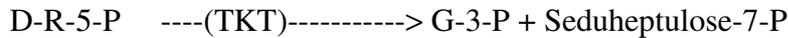
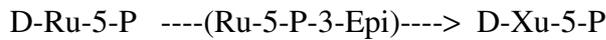
2.2.11 Enzymassays

2.2.11.1 Transketolase-Enzymassay

Transketolaseaktivität wurde spektroskopisch nach Kochetov (Methode B, 1982) bestimmt. Dabei wurde die Konzentrationsabnahme von NADH durch Messen der Extinktion bei 340 nm gemessen.

Durch Ribulose-5-P-3-Epimerase [EC 5.1.3.1] wird Ribulose-5-P (Ru-5-P) in das Donorsubstrat Xylulose-5-P (Xu-5-P) überführt. Aktive Transketolase kann aktivierte Glykolaldehydeinheiten von Xu-5-P auf Ribose-5-P (R-5-P) übertragen. Bei dieser Reaktion entsteht Glycerinaldehyd-3-P. Eine Triosephosphatisomerase (TPI) wandelt Glycerinaldehyd-3-P (G-3-P) in Dihydroxyaceton-P (DHAP) um, welches mittels einer α -Glycerophosphat-

dehydrogenase (α -GDH) in einer NADH verbrauchenden Reaktion in Glycerolphosphat überführt wird.



Das Reaktionsvolumen der Assays betrug 1 ml. Die Messungen erfolgten bei 25 °C. Die Endkonzentrationen der einzelnen Komponenten des Aktivitätstestes im Assay betragen 58 mM Gly-Gly (pH 7,7); 1,7 mM R-5-P; 1,7 mM Ru-5-P; 0,002% TPP; 15 mM MgCl₂; 0,13 mM β -NADH; 1 U Ru-5-P-3-Epi; 2 U TPI; 0,2 U α -GDH. Die Extinktionsabnahme bei 340 nm wurde kontinuierlich verfolgt. Die spezifische Aktivität [U/mg] errechnet sich wie folgt:

$$\text{Spez. A.} = (\Delta E_{340}/\text{min.}[\text{Test}] - \Delta E_{340}/\text{min.}[\text{Vergleich}]) \cdot (V) \cdot (D) / (\epsilon) \cdot (V_{\text{TK}})$$

ΔE_{340} = Extinktionsdifferenz Test/Vergleichsprobe

V = Totales Volumen

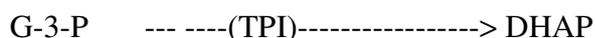
D = Verdünnungsfaktor

ϵ = Millimolarer Extinktionskoeffizient von β -NADH bei 340 nm = 6,22

V_{TK} = eingesetztes Volumen der eingesetzten Fraktionen

2.2.11.2 Aldolase-Enzymassay

Aldolaseaktivität wurde nach Bergmeyer (1974) bestimmt. Fruktose-1,6-P₂ wird mittels Aldolase in Glycerinaldehyd-3-P und Dihydroxyaceton-P gespalten. Eine Triosephosphatisomerase wandelt das entstehende Glycerinaldehyd-3-P zusätzlich Dihydroxyaceton-P um, welches mittels einer α -Glycerolphosphatdehydrogenase in einer NADH verbrauchenden Reaktion in Glycerolphosphat überführt wird. Gemessen wird die NADH Abnahme mit der Zeit.



Das Reaktionsvolumen der Assays betrug 1 ml. Die Messungen erfolgten bei 25 °C. Die Endkonzentrationen der einzelnen Komponenten des Aktivitätstestes im Assay betragen

90 mM KAc; 10 mM Tris HCl (pH 7,4); 0,13 mM β -NADH; 1,9 mM Fru-1,6-P₂; 5 U α -GDH/TPI (basierend auf der α -GDH-Aktivität). Die Extinktionsabnahme bei 340 nm wurde kontinuierlich verfolgt. Die spezifische Aktivität [U/mg] errechnet sich wie folgt:

$$\text{Spez. A.} = (\Delta E_{340}/\text{min.}[\text{Test}] - \Delta E_{340}/\text{min.}[\text{Vergleich}]) \cdot (V) \cdot (D) / 2 \cdot (\epsilon) \cdot (V_{\text{TK}})$$

ΔE_{340}	=	Extinktionsdifferenz Test/Vergleichsprobe
V	=	Totales Volumen
D	=	Verdünnungsfaktor
2	=	Pro Mol Fru-1,6-P ₂ werden 2 Mol DHAP gebildet
ϵ	=	Millimolarer Extinktionskoeffizient von β -NADH bei 340 nm = 6,22
V_{TK}	=	eingesetztes Volumen der eingesetzten Fraktionen

2.2.11.3 Enzymatische Bestimmung von β -Hydroxypyruvat

β -Hydroxypyruvat kann in Abwesenheit von Pyruvat durch LDH (L-Lactat:NAD-oxidoreduktase) [EC 1.1.1.27] zu L-Glycerat reduziert. Alternativ kann es durch eine D-Glycerat Dehydro-genase [EC 1.1.1.29] aus tierischen oder pflanzlichen Gewebe zu D-Glycerat reduziert. Letzte Reaktion kann auch in Anwesenheit von Pyruvat verwendet werden und wurde im Rahmen dieser Arbeit angewendet (Bergmeyer, 1974).



Das Endvolumen der Assays betrug 1 ml. Die Endkonzentrationen in den Assays betragen: 50 mM Tris (pH 7,8), 270 μ M NADH, 35 mU D-Glycerat Dehydrogenase [EC 1.1.1.29], 20-150 μ M β -Hydroxypyruvat. Die Veränderung der NADH-Konzentration wurde spektroskopisch nach Kochetov (Methode B, 1982) bei 340 nm bestimmt.

2.2.11.4 Substratspezifität von Transketolase

2.2.11.4.1 Donorsubstrat

22 U aufgereinigte Transketolase (Aktivitätsbestimmung siehe 2.4.6.1) aus frischem und 11 U aufgereinigte Transketolase aus 28 h wiederbewässertem Blattgewebe wurden in einem Endvolumen von 10 ml bzw. 5 ml mit 58 mM Gly-Gly (pH 7,7); 0,01 % NaN₃, 5,3 mM R-5-P; 0,002% TPP; 15 mM MgCl₂ und 16 mM Donorsubstrat (β -Hydroxypyruvat, Hydroxyaceton-Phosphat oder Fruktose-6-P (Fru-6-P) für 24 h bei 25 °C inkubiert. Nach dem Mischen wurden die Ansätze jeweils halbiert. Nach 8 h und 24 h wurden Proben entnommen

und mittels HPLC die Bildung des Übertragungsproduktes Sedoheptulose-7-P (Sed-7-P) untersucht. Insgesamt wurden folgende Ansätze inkubiert:

Transketolase	Verhältnis		Anzahl der		Donorsubstrat
	Akzeptor-Donor		Ansätze		
unbehandeltes Blattgewebe	1:1	1:3	2	2	Hydroxyaceton-Phosphat
unbehandeltes Blattgewebe	1:1	1:3	2	2	β -Hydroxypyruvat
unbehandeltes Blattgewebe	1:1	1:3	2	2	Fruktose-6-P
28 h rehydriertes Blattgewebe	1:1	1:3	2	2	Hydroxyaceton-Phosphat
28 h rehydriertes Blattgewebe	1:1	1:3	2	2	β -Hydroxypyruvat
28 h rehydriertes Blattgewebe	1:1	1:3	2	2	Fruktose-6-P

2.2.11.4.2 Akzeptorsubstrate

20 U aufgereinigte Transketolase (Aktivitätsbestimmung siehe 2.4.6.1) aus unbehandeltem und 12 U aufgereinigte Transketolase aus 28 h wiederbewässertem Blattgewebe wurden in einem Reaktionsvolumen von 10 ml bzw. 6 ml mit 58 mM Gly-Gly (pH 7,7); 0,01 % NaN_3 , 0,002% TPP; 15 mM MgCl_2 , 16 mM β -Hydroxypyruvat und 5,3 mM Akzeptorsubstrat (Glukose-6-P (Glc-6-P), UDP-Glukose, Glukose, Ribose-5-P) für 24 h bei 25 °C inkubiert. Nach dem Mischen wurden die Ansätze jeweils halbiert. Nach 8 h und 24 h wurden Proben entnommen und mittels HPLC die Bildung von Übertragungsprodukten untersucht. Bei Glukose als Akzeptorsubstrat wurden zusätzlich nach 240 h Proben entnommen. Die Ausbeute wurde hier mittels GC/FID ermittelt, da 2-D-glycero-D-ido-Oktulose mittels PAD nicht quantifiziert werden kann (siehe auch 3.1.1).

Weiterhin wurden Ansätze mit R-5-P und Glc-6-P mit 20 U (10 ml Reaktionsvolumen) einer kommerziell erwerbbaeren Transketolase aus Hefe (SIGMA, Deisenhofen) inkubiert.

2.2.11.4.3 Inhibition von Transketolase

Zur Bestimmung des Hemmtyps von Glc-6-P wurde die Transketolaseaktivität aufgereinigter Transketolase bei konstanter R-5-P-Konzentration (7,5 mM) und variablen Xu-5-P-Konzentrationen (0; 0,085; 0,17 und 1,7 mM) ermittelt. Jede Konzentrationspaarung wurde mit unterschiedlichen Glc-6-P-Konzentrationen (0; 5,3 mM und 31,8 mM) gemessen. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte ansonsten wie unter 2.4.6.1 beschrieben. Durch Auswertung der Michaelis-Menten- und Lineweaver-Burk-Plots konnte der Hemmtyp bestimmt werden.

2.2.12 MALDI TOF-MS-Untersuchungen

2.2.12.1 Entfärbung von Proteinspots aus 2D-PAGE

Aus einem 2D-PAGE wurde der entsprechende Spot ausgeschnitten. Zur Entfärbung wurde das Gelstück in einem 1 ml-Eppendorfgefäß mehrmals mit 100 µl 25 mM NH_4HCO_3 in einem MeOH- H_2O -Gemisch (1:1) bis zur Farblosigkeit inkubiert. Anschließend wurde das Gelstück für 30 min. in einer HAc:MeOH: H_2O -Mischung (10:45:45) inkubiert, gefolgt von 30 min. Waschen mit H_2O dest, Schrumpfen des Stückes durch Überschichten mit Acetonitril und Trocknen mittels SpeedVac.

2.2.12.2 Verdau von Protein durch Trypsin

Präparation einer 100 ng/µl Stammlösung Trypsin (sequencing grade, modified Trypsin, Promega, Mannheim). Als Reaktionslösung diente eine Verdünnung der Stammlösung mit 4 Teilen 50 mM NH_4HCO_3 -Lösung. Pro Gelstück wurden 20 µl (400 ng Trypsin) zugegeben und für 30 min. bei 37 °C inkubiert. Im Fall von überschüssiger Trypsin-Lösung, wurde diese entfernt. Weiterhin wurden 100 µl einer 50 mM NH_4HCO_3 -Lösung zugesetzt und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.12.3 Entsalzen der Proben mit Zip Tip-µC18

Das Zip Tip wurde zunächst viermal mit 10 µl 50% ACN und 0,1% TFA gewaschen. Die Äquilibration erfolgte durch viermaliges Waschen mit 10 µl 0,1% TFA. Peptidlösungen wurden in 3 µl Fraktionen geladen (zwischen drei- und zehnmal). Anschließend wurde viermal mit 10 µl 0,1% TFA gewaschen und Peptide mit 3 µl 50% ACN und 0,1% TFA eluiert.

2.2.12.4 MALDI TOF-MS-Analysen

Zu untersuchende Proben wurden in 125 µl 0,1% TFA gelöst und mit 125 µl einer gesättigten HCCA-Lösung (Matrix) versetzt. 1 µl bzw. 0,5 µl der Lösung wurden auf Targetplatten aufgetragen und bei Raumtemperatur getrocknet. Die Proteine auf den Targetplatten wurde in einem ToF Spec 2E (Micromass, Rydalmere, Australia) analysiert.

2.2.13 Extraktion nicht flüchtiger, organischer Säuren aus *Craterostigma plantagineum*

9,8 g Pflanzenmaterial von 36 h wiederbewässertem Blattgewebe wurde gemörsert und mit 5 ml/g FW 80 % (v/v) EtOH 30 min. unter Rückfluss gekocht. Grobes Gewebe wurde durch eine kurze Zentrifugation (12.000 U/min., JA-14-Rotor, J2-HS-Zentrifuge, Beckman, München) entfernt und der Überstand bis zur Trockene eingeeengt. Der Rückstand wurde in 10 ml H₂O dest aufgenommen und auf eine DEAE-Anionentauschersäule gegeben (1cm x 20 cm; Flussrate: 1 ml/min). Die Säule wurde zuvor mit 1 M Na₂CO₃, H₂O und 0,5 M HCl gewaschen. Die Aktivierung erfolgte mit 100 ml 1M Na₂CO₃. Die Säule wurde mit Wasser gewaschen, bis das Eluat neutral reagierte. Nach Aufbringen des Extraktes wurde mit einem dreifachen Säulenvolumen H₂O dest gewaschen und organische Säuren mit 1 M (NH₄)₂CO₃ eluiert. Zur Entfernung überschüssigen (NH₄)₂CO₃ wurde das Eluat mit 1 g Kationentauscher (Dowex 50WX8, 200-400 mesh) pro 10 ml Eluat versetzt. Das Eluat wurde zur Abtrennung des Ionentauschers 10 min. zentrifugiert (12.000 U/min., JA-14-Rotor, J2-HS-Zentrifuge, Beckman, München). Anschließend wurde das Eluat auf 1 ml eingeeengt und definierte Volumina Silikagel 60-Platten (VWR, Darmstadt) aufgetragen, mit einem Gemisch von chromatographisch aufgetrennt und die R_f-Werte ermittelt. Die Detektion erfolgte mittels Bromphenolblau: 40 mg Bromphenolblau wurden in 100 ml 95% Ethanol gelöst und bis zur Blaufärbung (pH 6,7) 0,1 n Natronlauge zugegeben. Die DC-Platten wurden mit der Lösung benetzt. Säuren zeigten sich als dunkelblaue Spots auf hellblauem Grund.

3. Ergebnisse

3.1 Isolierung von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose aus *Craterostigma plantagineum*

Das Trockengewicht von unbehandeltem Blattgewebe von *C. plantagineum* besteht bis zu 50% aus 2-D-glycero-D-ido-Oktulose (Bianchi et al., 1991). Aus diesem Grund wurden *C. plantagineum*-Blätter als Quelle für einen 2-D-glycero-D-ido-Oktulose-Standard genutzt. Nach erfolgter methanolischer Zuckerextraktion (2.2.2.1.1) wurde das Extrakt über eine Dowex-50WX8-Kationentauscher-, eine Dowex-1X8-Anionentauscher- und eine Aktivkohlesäule gegeben (2.2.2.1.2). Die Ionentauschersäulen dienten zur Entfernung von Aminosäuren und anderen geladenen Substanzen. Die Aktivkohlesäule wurde zur Entfärbung, Abtrennung von Oligosacchariden und Auftrennung der Mono- und Disaccharide genutzt.

Die Elution von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose von der Aktivkohlesäule erfolgte über 215 Fraktionen (Abb.3-1). Andere Mono- und Disaccharide eluierten hingegen zwischen Fraktion 15 und 70. Raffinose und Stachiose werden von Aktivkohle absorbiert. In höheren Fraktionen wurde 2-D-glycero-D-ido-Oktulose mit einer Reinheit von bis zu 99,5 % isoliert (GC-FID/GC-MS-Messung, 2.2.6). Die Fraktionen 80 bis 225 wurden vereint und am Rotationsverdampfer eingengt.

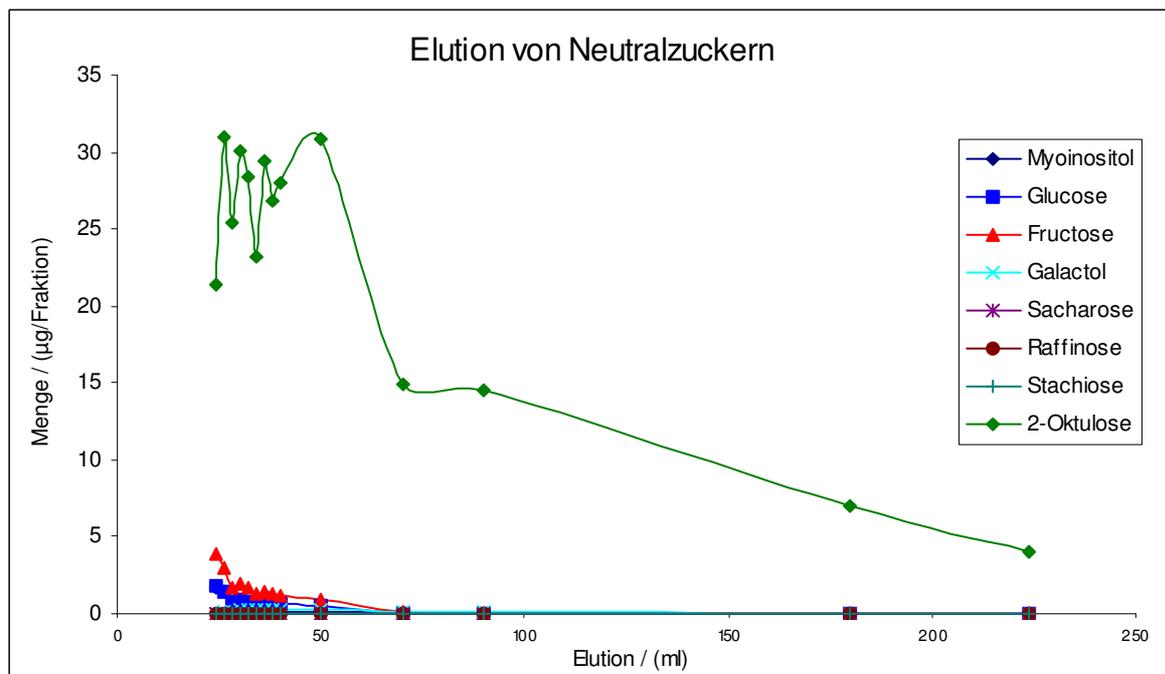


Abb.3-1: Elution verschiedener Zuckerkomponenten aus *C. plantagineum* von einer Aktivkohlesäule.

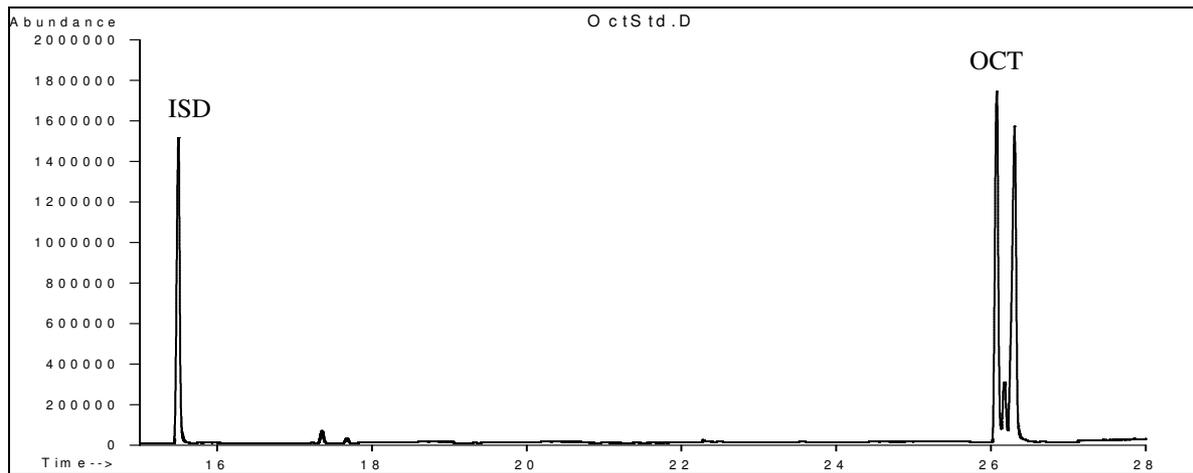


Abb.3-2: GC-Chromatogramm des aufgereinigten 2-D-glycero-D-ido-Oktulosestandards (26,003 bis 26,314 min). Als interner Standard diente Xylitol (15,243 min). 2-D-glycero-D-ido-Oktulose eluiert in drei Peaks von der verwendeten DB1-Säule (2.2.6).

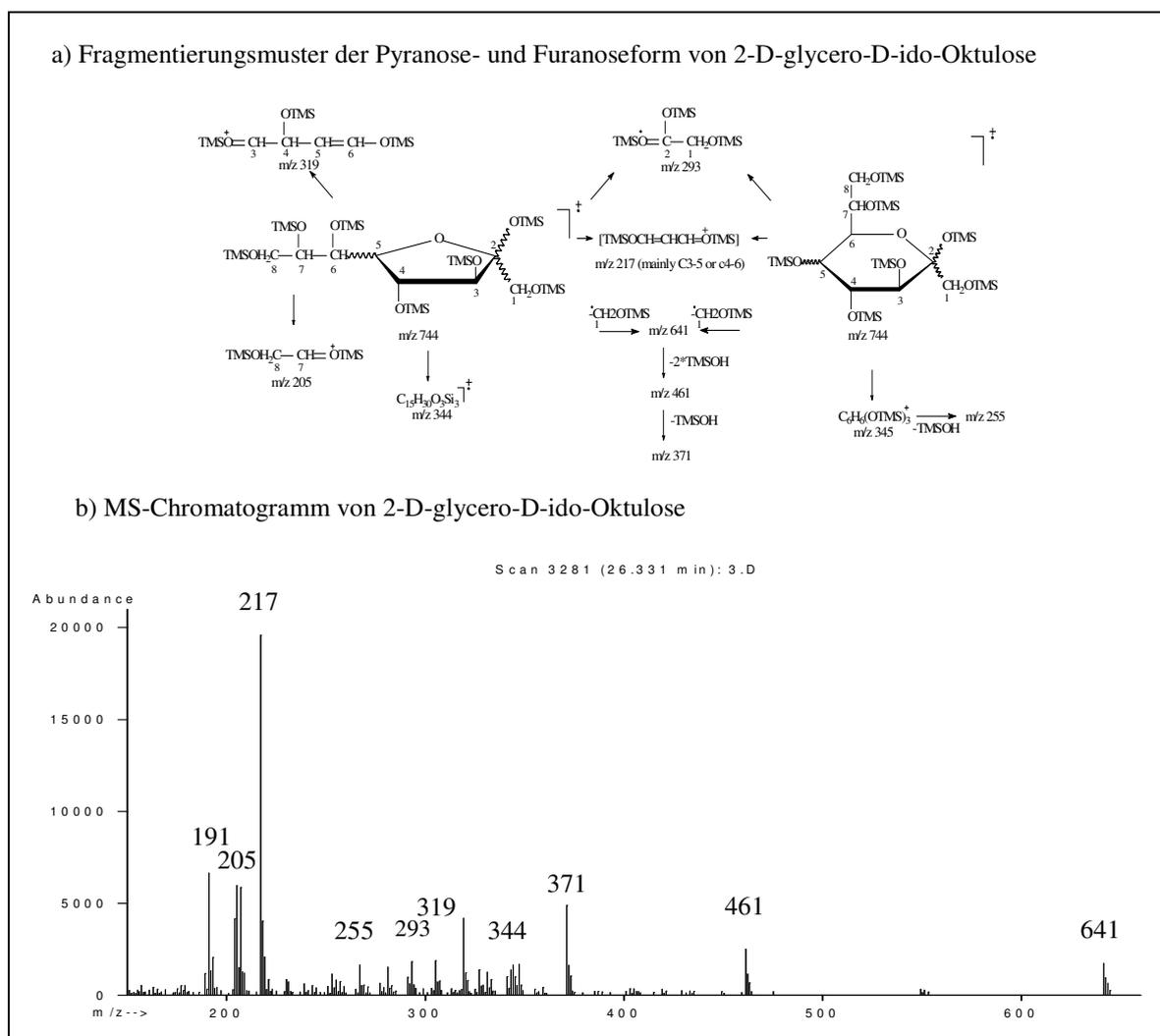


Abb. 3-3: a) Fragmentierungsmuster der Furanose- und der Pyranoseform von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose und Angabe der primären C-Positionen in den einzelnen Massefragmenten (Irvine et al., 1992). b) Wichtige Massefragmente zur Identifizierung von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose.

Die Ausbeute an 2-D-glycero-D-ido-Oktulose aus 84 g unbehandelten Blättern (DW = 8,4 g) nach der methanolischen Extraktion betrug 3,67 g (43,7 mg/100 mg DW). Nach Elution über zwei Ionentauschersäulen und eine Aktivkohlesäule (Abb. 3-1) wurden 1,44 g 2-D-glycero-D-ido-Oktulose mit einem Reinheitsgrad von über 98 % gewonnen (Abb. 3-2). Die Identifizierung erfolgte mittels GC/MS (Abb.3-3).

Die parallel zur Quantifizierung von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose in den Fraktionen einer Aktivkohlesäule mittels GC/FID (Abb. 3-1) durchgeführte Quantifizierung der Substanz mittels HPLC/PAD-Analytik (Chromatographie: Carbo-Pac-PA100-Säule, Detektion: *pulsed amperometric detection* (PAD)) zeigte deutliche Diskrepanzen in den detektierten 2-D-glycero-D-ido-Oktulosemengen (Abb. 3-4). Die ermittelten Werte der 2-D-glycero-D-ido-Oktulose-mengen mittels HPLC/PAD-Analytik lagen teilweise um einen Faktor 3 höher oder niedriger als die ermittelten Werte der 2-D-glycero-D-ido-Oktulosemengen mittels GC/FID.

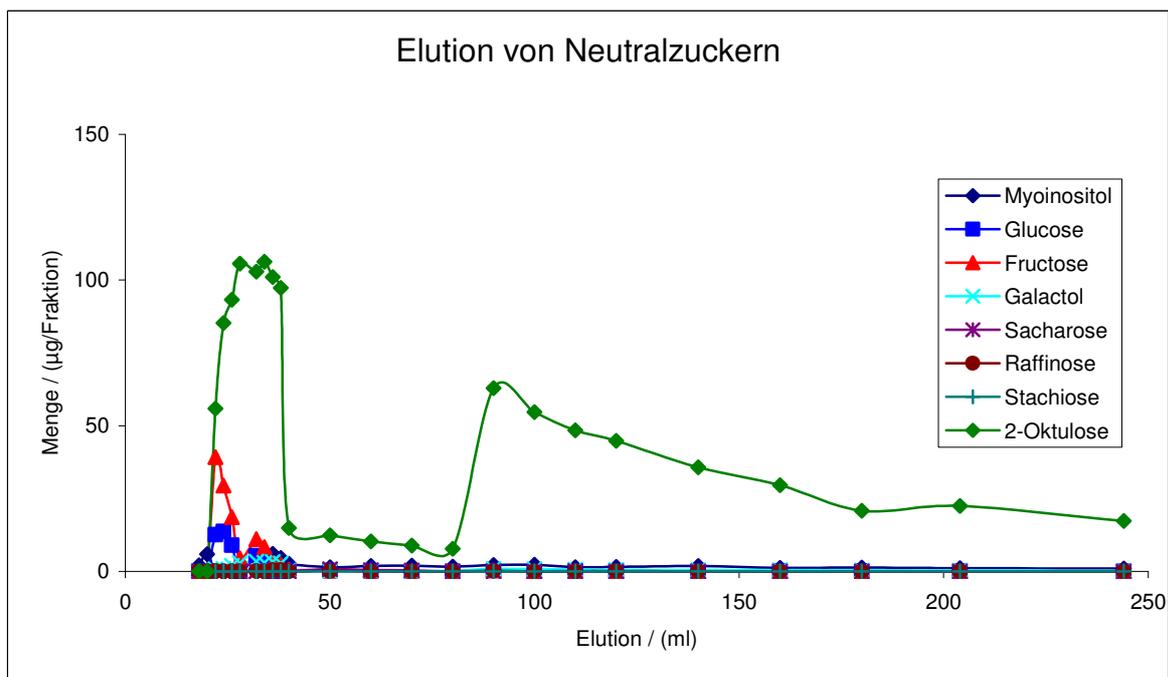


Abb.3-4: Parallel zur Quantifizierung von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose in den einzelnen Fraktionen nach Elution von einer Aktivkohlesäule mittels GC/FID wurde eine Quantifizierung von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose mittels PAD nach Isolierung der Substanz mittels einer Carbo-Pac-PA100-Säule durchgeführt (vergl. Abb. 3-1).

2-D-glycero-D-ido-Oktulose eluierte von der benutzten Carbo-Pac-PA100-Säule, im Gegensatz zu anderen untersuchten Zuckerstandards, in einem breiten, unsymmetrischen Peak, der eine genaue Quantifizierung unmöglich machte (Abb. 3-5).

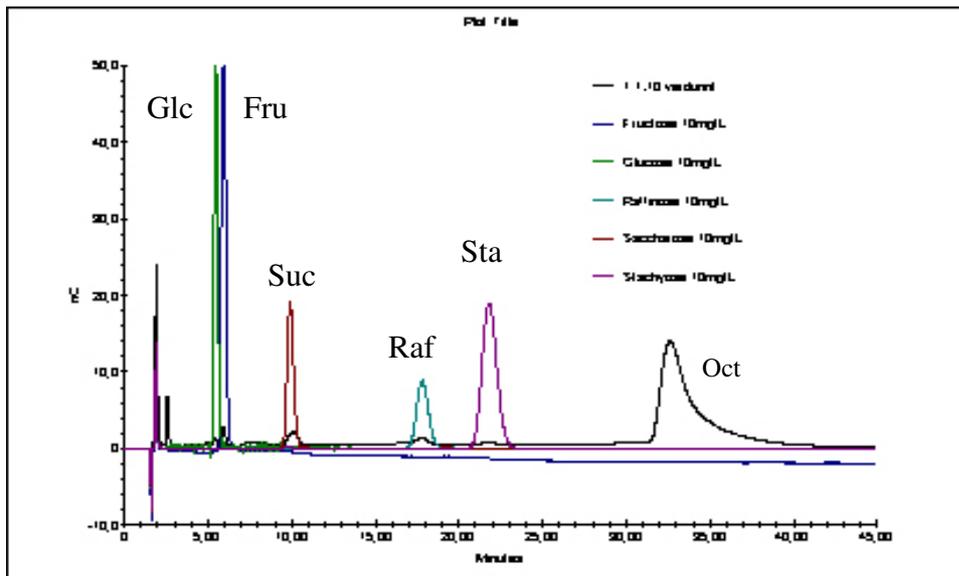


Abb.3-5: Auftrennung von Sacchariden auf einer Carbo-Pac-PA100-Säule. Die Detektion erfolgte mittels *pulsed amperometric detection* (PAD).

Es wurden Vergleichsmessungen von genauen Einwaagen des hergestellten 2-D-glycero-D-ido-Oktulosestandards mit Myo-Inositol und Xylitol als interne Standards mittels GC/FID- und HPLC/PAD-Analytik durchgeführt. Das für diese Messungen neben Xylitol als interner Standard benutzte Myo-Inositol konnte auch in *C. plantagineum* nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde Myo-Inositol zur Quantifizierung von Zuckerkomponenten aus *C. plantagineum* und anderen, verwandten Arten im weiteren nicht benutzt. Die Ergebnisse der Messungen mit Xylitol als interner Standard sind in Tab. 3-1 zusammengefasst.

Tab. 3-1: Quantifizierung von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose mittels HPLC/PAD und GC/FID.

HPLC/PAD				GC/FID			
Xylitol Einwaage [mg/ml]	2-D-glycero-D-ido-Oktulose Einwaage [mg/ml]	detektierte Menge [mg/ml]	Fehler [%]	Xylitol / [µg] Einwaage [µg/µl]	2-D-glycero-D-ido-Oktulose Einwaage [µg/µl]	detektierte Menge [µg/µl]	Fehler [%]
5	5	15,7	314	5	2	2,07	3,50
5	25	61,8	147	5	5	5,04	0,80
5	50	146,7	193	5	10	10,21	2,10
25	5	16,6	232	5	15	15,13	0,87
25	25	34,2	37	5	20	20,14	0,70
25	50	127,5	155	5	25	25,22	0,88
50	5	10,9	118	5	2	2,13	6,50
50	25	76,4	206	10	5	5,16	3,20
50	50	98,5	97	10	10	10,08	0,80
100	5	13,8	176	10	15	15,1	0,67
100	25	54,7	119	10	20	20,16	0,80
100	50	163,8	228	10	25	25,07	0,28

Der Fehler der detektierten 2-D-glycero-D-ido-Oktulose mittels GC/FID bezogen auf die eingewogene Substanzmenge betrug maximal 3,5%. Der Fehler bei der Quantifizierung von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose mittels der genutzten HPLC/PAD-Analytik lag teilweise bei über 300%. Andere Neutralzucker und Phosphatzucker konnten mit der HPLC/PAD-Analytik sinnvoll quantifiziert werden. Die CarboPac-Pa100-Säule wurde aus diesem Grund im weiteren Verlauf der Arbeit im Fall von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose nur zu qualitativen Kontrollmessungen eingesetzt.

3.2 Zuckerkomponenten in einigen Arten aus der Familie der afrikanischen Linderniae

3.2.1 2-D-glycero-D-ido-Oktulose Anteil in Blättern von *Craterostigma plantagineum*

Bevor Untersuchungen zur Veränderung von Zuckerzusammensetzungen in *C. plantagineum* während Trockenstress durchgeführt wurden, wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen dem Alter von Blättern oder dem Nährmedium der Pflanzen und der 2-D-glycero-D-ido-Oktulosekonzentration besteht. Zu diesem Zweck wurden unterschiedlich alte Blattpaare von Pflanzen aus einer Sterilkulturanzucht, aus Erde und aus Hydrokultur gesammelt. Die jüngsten, inneren Blätter wurden mit a bezeichnet. Von jedem Blattpaar wurde ein Blatt zur Bestimmung des Trockengewichtes herangezogen (2.2.1.4) und das zweite Blatt extrahiert (2.2.2.1). Es konnte keine Abhängigkeit des 2-D-glycero-D-ido-Oktuloseanteils im Blattgewebe vom Alter der Blätter oder vom benutzten Nährmedium beobachtet werden. Die 2-D-glycero-D-ido-Oktulosekonzentrationen in den untersuchten Blättern zeigten keine signifikanten Schwankungen (Abb.3-6).

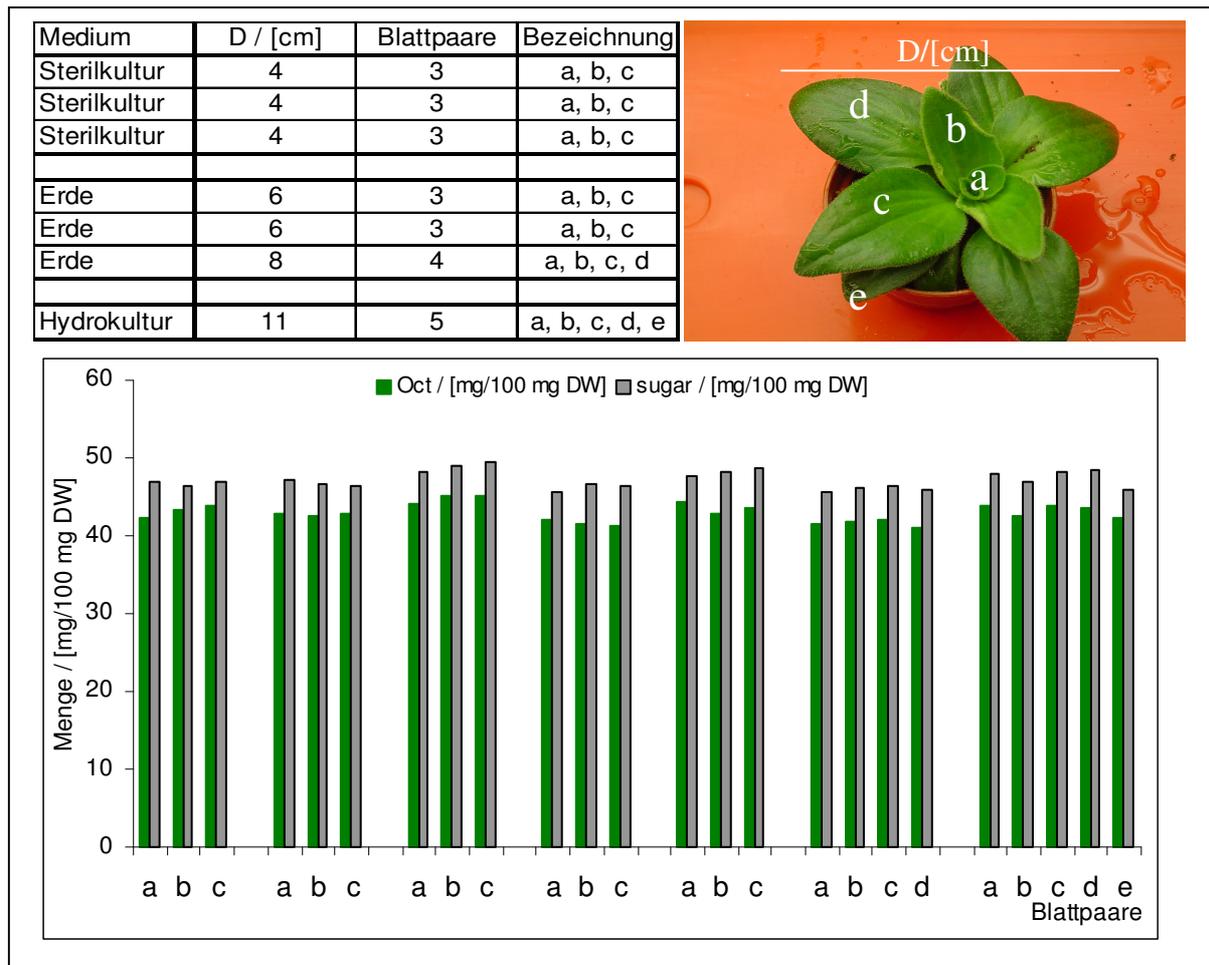


Abb.3-6: Es wurde der 2-D-glycero-D-ido-Oktulosegehalt in verschiedenen alten Blättern von Pflanzen aus Erde, Steril- und Hydrokultur bestimmt. Die verschiedenen alten Blattpaare wurden mit a (jüngstes, inneres Blattpaar einer Pflanze) bis e (ältestes, äußeres Blattpaar einer Pflanze) bezeichnet. Die Größe der kompletten Pflanzen wurde durch den Durchmesser D der Pflanzen angegeben. Das Diagramm zeigt die detektierten 2-D-glycero-D-ido-Oktulosemengen und die Gesamtzuckermenge bestehend aus 2-D-glycero-D-ido-Oktulose, Saccharose, Fruktose und Glukose in den verschiedenen alten Blättern der verschiedenen Pflanzen.

3.2.2 Zuckerszusammensetzung von *Craterostigma plantagineum* in unbehandeltem und getrocknetem Zustand

Die Zusammensetzungen der Neutralzuckerkomponenten in Wurzel- und Blattgewebe von *C. plantagineum* unterscheiden sich sowohl im unbehandelten wie auch im getrockneten Zustand voneinander. Der Hauptzuckerbestandteil in unbehandelten Blättern ist 2-D-glycero-D-ido-Oktulose. Die C8-Ketose macht bis zu 45% des Trockengewichtes aus. Weitere detektierte Neutralzucker sind in Tab.3-2 aufgeführt. Die Werte wurden mittels GC/FID bestimmt.

Tab.3-2: Zuckerkomponenten in *C. plantagineum* Die Werte stammen von vier 1,5 cm großen Pflanzen aus einer Sterilkultur und je zwei 10 cm großen Pflanzen aus einer Hydrokultur bzw. aus Erde.

Zucker	Sterilkultur				Hydrokultur		Erde	
	Menge / [mg/g DW]		Menge / [mg/g DW]		Menge / [mg/g DW]		Menge / [mg/g DW]	
	Frische Blätter	Getrocknete Blätter	Frische Wurzeln	Getrocknete Wurzeln	Frische Wurzeln	Getrocknete Wurzeln	Frische Wurzeln	Getrocknete Wurzeln
Glukose	15 ± 3,2	17 ± 3,8	0,5 ± 0,3	0,6 ± 0,3	6,8 ± 1,0	2,1 ± 0,4	5,8 ± 1,0	1,2 ± 0,2
Fruktose	10 ± 1,2	6 ± 0,9	<0,1	<0,1	7,2 ± 0,3	4,9 ± 0,4	3,3 ± 0,6	4,3 ± 0,3
Saccharose	17 ± 1,0	405 ± 27,9	59,8 ± 6,0	58,4 ± 20,0	54,1 ± 2,9	28,3 ± 1,1	46,5 ± 5,5	24,5 ± 1,8
2-Oktulose	442 ± 31,2	17 ± 0,4	21,8 ± 9,0	14,3 ± 3,8	13,8 ± 0,8	5,1 ± 0,2	15,3 ± 2,1	7,3 ± 1,2
Sedoheptulose	2 ± 0,2	1 ± 0,5	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Myo-Inositol	4 ± 0,3	3 ± 0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Raffinose	<0,5	<0,5	26,3 ± 3,2	31,3 ± 11,9	34,4 ± 3,9	19,4 ± 2,7	26,4 ± 5	27,8 ± 2,9
Stachyose	<0,5	<0,5	73,5 ± 3,9	75,3 ± 13,8	361,2 ± 7,7	187 ± 9,4	339,4 ± 11,3	189 ± 14,2

Die Änderungen im Zuckerhaushalt des Blattgewebes bei Wasserverlust sind gravierend. 2-D-glycero-D-ido-Oktulose ist in ausgetrockneten Blättern fast vollständig metabolisiert worden. An Stelle von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose ist Saccharose hier mit ca. 40% des Trockengewichtes ausgetrockneter Blätter die Hauptzuckerkomponente (Tab. 3-2).

Im Wurzelgewebe von *C. plantagineum* herrschen Zucker der Raffinoseserie vor (Saccharose, Raffinose, Stachyose). Bei unbehandeltem und getrocknetem Wurzelgewebe aus jungen Sterilkulturpflanzen ist keine große Veränderung in den Zuckerkonzentrationen zu beobachten. Lediglich die Konzentration von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose ist in getrocknetem Wurzelgewebe etwas verringert. In Wurzelgeweben von älteren Pflanzen, die auf Erde bzw. Hydrokultur kultiviert wurden, zeigt sich während der Dehydrierung der Pflanzen eine Metabolisierung von Saccharose, Raffinose und Stachyose um jeweils fast 50%. Im Wurzelsystem konnten keine signifikanten Mengen an Galaktose nachgewiesen werden. Bei der Metabolisierung von Raffinose und Stachyose entstehende Galaktose wird demnach nicht im Wurzelsystem eingelagert. Glukose, Fruktose und 2-D-glycero-D-ido-Oktulose, die übrigen Zucker des Wurzelsystems, zeigen in ausgetrockneten Wurzeln, wie die Zucker der Raffinoseserie, eine geringere Konzentration als im unbehandelten Gewebe.

3.2.3 Messung von Neutralzuckern in verschiedenen Pflanzen

Crepidiorhopalon, *Lindernia* und *Craterostigma* gehören alle der Familie der *Linderniaceae* an. Aufgrund dieser Verwandtschaft wurde frisches und getrocknetes Blattgewebe verschiedener Pflanzenarten auf die für Trockentoleranz wichtige *compatible solute* Saccharose und deren vermutete Speicherform in unbehandeltem Gewebe, 2-D-glycero-D-ido-Oktulose, untersucht. Die Extraktion der Zucker erfolgte wie unter 2.3.1.1 beschrieben. Die Zucker wurden mittels GC/FID und GC/MS identifiziert und quantifiziert.

Die verwendeten *C. plantagineum*-Pflanzen wuchsen auf Hydrokultur. *L. brevidens*, *L. rotundifolia*, *L. philcoxii* und *Crep. lactibracteatus* wurden auf Erde kultiviert. Proben von *L. acicularis*, *L. subracemosa*, *L. numerilarifolia* und *L. exilis* wurden freundlicherweise von Prof. Fischer in Form von silikagelgetrocknetem Pflanzenmaterial zur Verfügung gestellt.

In Abb. 3-7 sind die 2-D-glycero-D-ido-Oktulose- und Saccharose-Konzentrationen in unbehandeltem Blattgewebe dargestellt. Abb. 3-8 zeigt die entsprechenden Zuckerkonzentrationen in getrocknetem Blattgewebe.

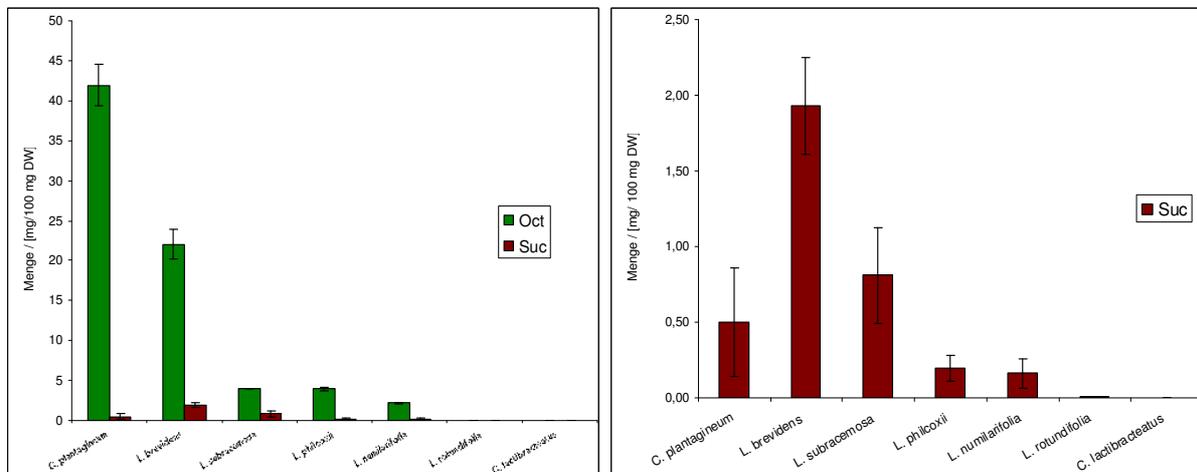


Abb.3-7: 2-D-glycero-D-ido-Oktulose- und Saccharoseanteile im Blattgewebe verschiedener, unbehandelter Pflanzen. Die ermittelten Konzentrationen beruhen jeweils auf vier Messungen.

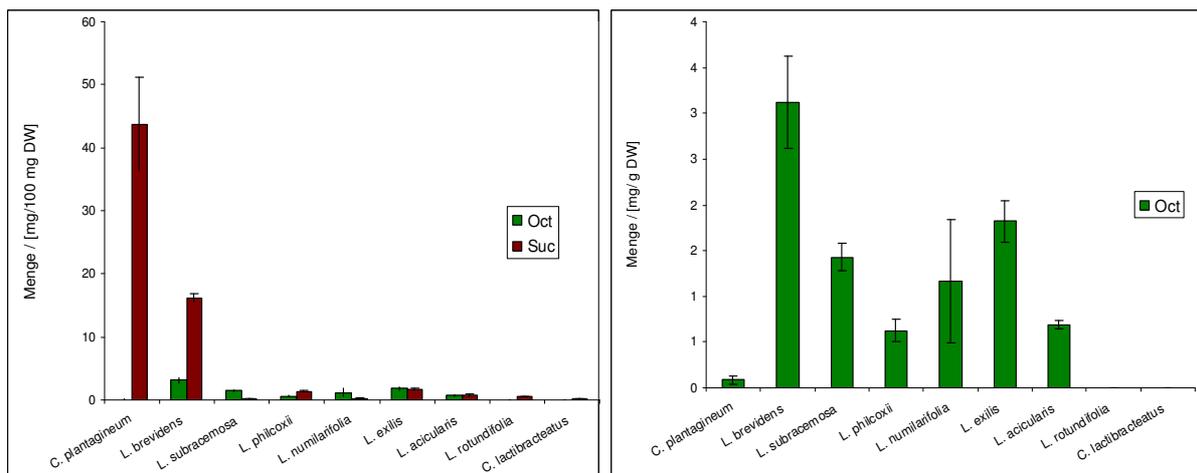


Abb.3-8: 2-D-glycero-D-ido-Oktulose- und Saccharoseanteile im Blattgewebe verschiedener, getrockneter Pflanzen. Die ermittelten Konzentrationen beruhen jeweils auf vier Messungen.

Tab.3-3: 2-D-glycero-D-ido-Oktulose- und Saccharoseanteile im Blattgewebe von *C. plantagineum*, verschiedenen *Lindernia*-Arten und *Crepidorrhopalon lactibracteatus*.

Art	unbehandeltes Blattgewebe		getrocknetes Blattgewebe	
	2-D-g-D-i-Oktulose	Saccharose	2-D-g-D-i-Oktulose	Saccharose
<i>C. plantagineum</i>	41,91±2,59	0,50±0,36	0,09±0,04	43,738±7,423
<i>L. brevidens</i>	22,04±1,82	1,93±0,32	3,12±0,51	16,18±0,60
<i>L. subracemosa</i>	4,00±0,00	0,81±0,32	1,43±0,14	0,18±0,06
<i>L. philcoxii</i>	3,96±0,23	0,20±0,09	0,63±0,13	1,36±0,09
<i>L. numilarifolia</i>	2,19±0,08	0,16±0,10	1,16±0,68	0,17±0,18
<i>L. exilis</i>	keine Probe vorhanden	keine Probe vorhanden	1,82±0,23	1,65±0,19
<i>L. acicularis</i>	keine Probe vorhanden	keine Probe vorhanden	0,69±0,04	0,76±0,13
<i>L. rotundifolia</i>	0,00±0,00	0,01±0,00	0,00±0,00	0,56±0,00
<i>Crep. lactibracteatus</i>	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,20±0,00

Neben den erwarteten großen Mengen 2-D-glycero-D-ido-Oktulose in *C. plantagineum* (Bianchi et al., 1991) wurden auch große Mengen der C8-Ketose in unbehandeltem Blattgewebe von *L. brevidens* gefunden (Tab.3-3). Die Identifizierung erfolgte mittels GC/MS. Sowohl Retentionszeit als auch MS-Fragmentierung entsprach einem 2-D-glycero-D-ido-Oktulose-Standard. Der Anteil der C8-Ketose in *L. brevidens* beträgt ca. 22 mg/100 mg Trockengewicht der unbehandelten Blätter. Weiterhin wurden geringere Mengen der C8-Ketose in unbehandeltem Blattgewebe von *L. numilarifolia*, *L. philcoxii* und *L. subracemosa* gefunden. In allen aufgezählten Pflanzen wurde 2-D-glycero-D-ido-Oktulose als

Hauptzuckerkomponente detektiert. Weiterhin konnten geringe Mengen von Saccharose, Glukose und Fruktose in allen Pflanzen nachgewiesen werden. In *L. brevidens* wurden neben den bereits beschriebenen Komponenten auch Spuren von Stachyose und Raffinose mittels GC/FID nachgewiesen. Unbehandeltes Blattgewebe von *L. rotundifolia* und *Crep. lactibracteatus* enthält keine 2-D-glycero-D-ido-Oktulose. Die Hauptzuckerkomponenten in diesen Pflanzen sind Saccharose, Glukose und Fruktose. Die gefundenen Mengen lagen in unbehandeltem Blattgewebe zwischen 0,1 und 0,4 mg/100 mg DW.

Zur Analyse der Zuckerkomponenten in getrockneten Pflanzen wurden *C. plantagineum*, *L. brevidens*, *L. philcoxii*, *L. rotundifolia* und *Crep. lactibracteatus* wie unter 2.2.1.2 beschrieben eingetrocknet. Pflanzenmaterial der anderen in Abb. 3-8 gezeigten Pflanzen wurde in Form von silikagelgetrocknetem Material freundlicherweise von Prof. Dr. E. Fischer zur Verfügung gestellt. Aufgrund der unnatürlichen, extrem schnellen Austrocknung besteht die Möglichkeit, dass trockenstressinduzierte Schutzmaßnahmen der Pflanzen, wie die Bildung von Saccharose, nicht oder nur teilweise stattfinden konnten.

Saccharose macht ca. 44% des Trockengewichtes der ausgetrockneten Blätter von *C. plantagineum* aus. Diese Mengen entsprechen fast genau den Mengen an 2-D-glycero-D-ido-Oktulose, die in unbehandelten Blättern zu finden sind.

Bei *L. brevidens* wurden ebenfalls große Mengen Saccharose nachgewiesen (ca. 18 mg/100 mg DW). Zusammen mit der noch vorhandenen Menge 2-D-glycero-D-ido-Oktulose entspricht die detektierte Menge dieser beiden Komponenten in getrockneten Blättern der Menge an 2-D-glycero-D-ido-Oktulose in unbehandelten Blättern.

In *L. numerilarifolia*, *L. philcoxii* und *L. subracemosa* konnten geringe Mengen 2-D-glycero-D-ido-Oktulose und Saccharose in ausgetrockneten Blättern nachgewiesen werden (je unter 5 mg/100 mg DW).

In getrockneten Blättern von *L. rotundifolia* und *Crep. lactibracteatus* konnten nur geringe Mengen Saccharose detektiert werden.

3.2.4 Veränderungen im Zuckerhaushalt von *Crepidorhopalon lactibracteatus*, *Lindernia rotundifolia*, *Lindernia philcoxii*, *Lindernia brevidens* und *Craterostigma plantagineum* unter Trockenstress

3.2.4.1 *Crepidorhopalon lactibracteatus*

Crep. lactibracteatus bildet während der Eintrocknungsphase keine größeren Mengen an Saccharose. Die Glukose- und Fruktosekonzentrationen steigen auf ca. 3 % des Trockengewichtes an. Es sind nur geringe Konzentrationen Saccharose und Myo-Inositol zu beobachten, die während der Eintrocknung leicht ansteigen (Abb.3-9).

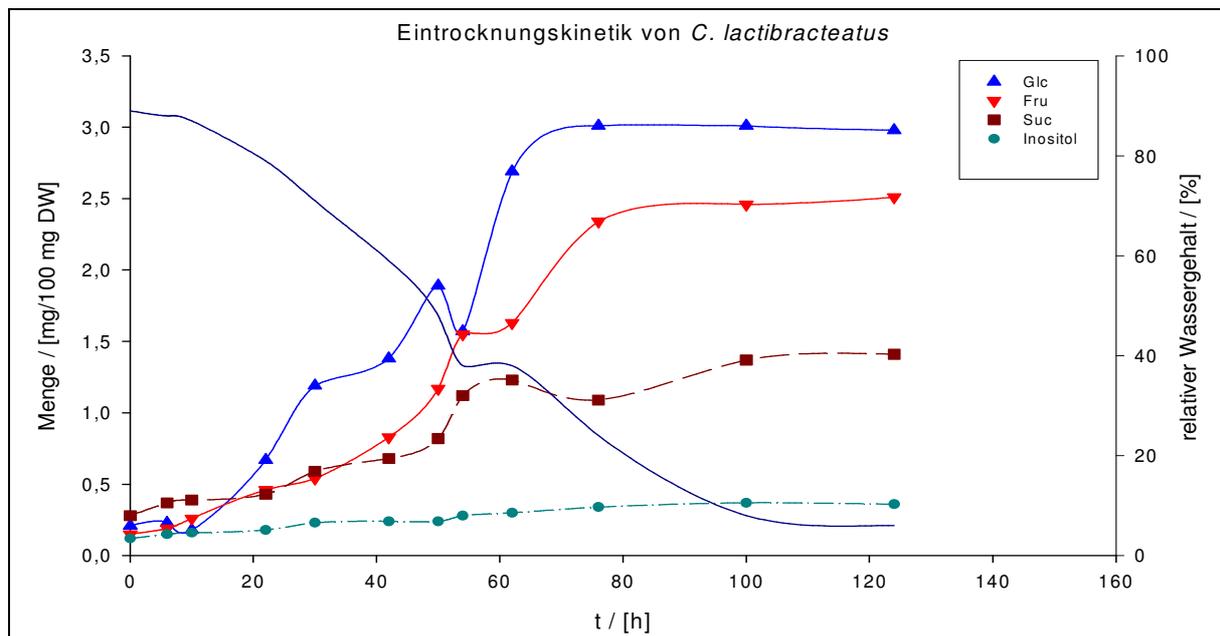


Abb.3-9: Veränderung im Zuckerhaushalt von *Crep. lactibracteatus* während der Eintrocknung.

Es war nicht möglich, diese Pflanzen nach einer Trockenperiode von 5 Tagen erfolgreich wiederzubewässern. Die Pflanzen sahen nach 24 h braun und schwammig aus und verrotteten in den folgenden Tagen.

3.2.4.2 *Lindernia rotundifolia*

L. rotundifolia bildet, wie *Crep. Lactibracteatus*, während der Eintrocknungsphase keine größeren Mengen an Saccharose. Es ist ebenfalls ein geringer Anstieg der Glukose- und Fruktosekonzentration zu beobachten. Keine der beiden Komponenten macht mehr als ca. 2 % des Trockengewichtes aus. Es konnten weiterhin geringe Mengen Saccharose, Galactose und Myo-Inositol detektiert werden, deren Konzentrationen sich während der Eintrocknung der Pflanze nur geringfügig ändern (Abb.3-10).

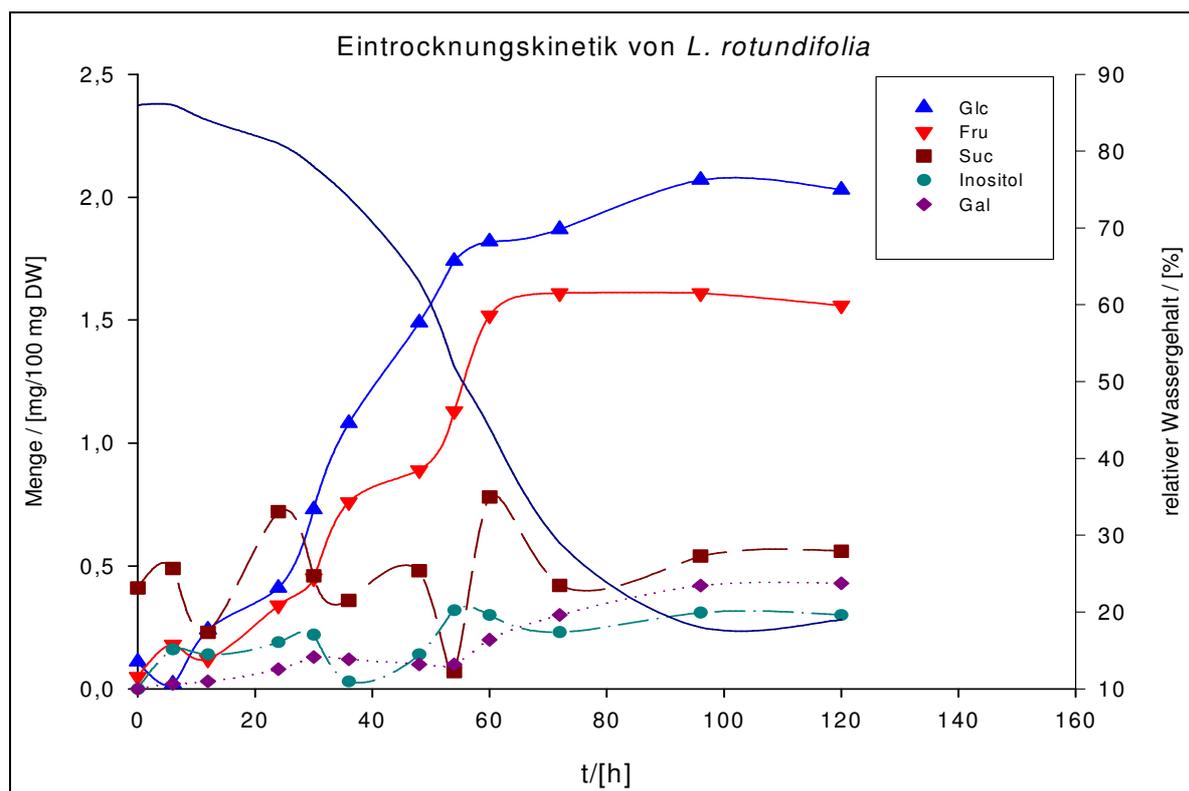


Abb.3-10: Veränderung im Zuckerhaushalt von *L. rotundifolia* während der Eintrocknung.

Es war nicht möglich, diese Pflanzen erfolgreich wiederzubewässern. Auch hier sahen die Pflanzen, wie bei *Crep. lactibracteatus*, nach 24 h braun und schwammig aus und verrotteten in den folgenden Tagen.

3.2.4.3 *Lindernia philcoxii*

L. philcoxii besitzt in unbehandeltem Zustand in ihren Blättern geringe Mengen der C8-Ketose 2-D-glycero-D-ido-Oktulose (bis zu 5 mg/100 mg DW). Weiterhin sind geringe Mengen Saccharose, Glukose, Fruktose und Myo-Inositol vorhanden. Spuren von Raffinose konnten ebenfalls nachgewiesen werden. Ob auch Spuren von Stachyose vorhanden sind, konnte nicht einwandfrei festgestellt



werden. Die Pflanzen metabolisieren während der Eintrocknungsphase einen Teil der 2-D-glycero-D-ido-Oktulose und bilden gleichzeitig Saccharose. Im getrockneten Zustand betrug die Saccharosekonzentration in den Blättern 3,5 mg/100 mg DW (Abb.3-11). Es war auch hier nicht möglich, die Pflanzen erfolgreich wiederzubewässern. Die Pflanzen sahen nach 24 h braun und schwammig aus und verrotteten in den folgenden Tagen.

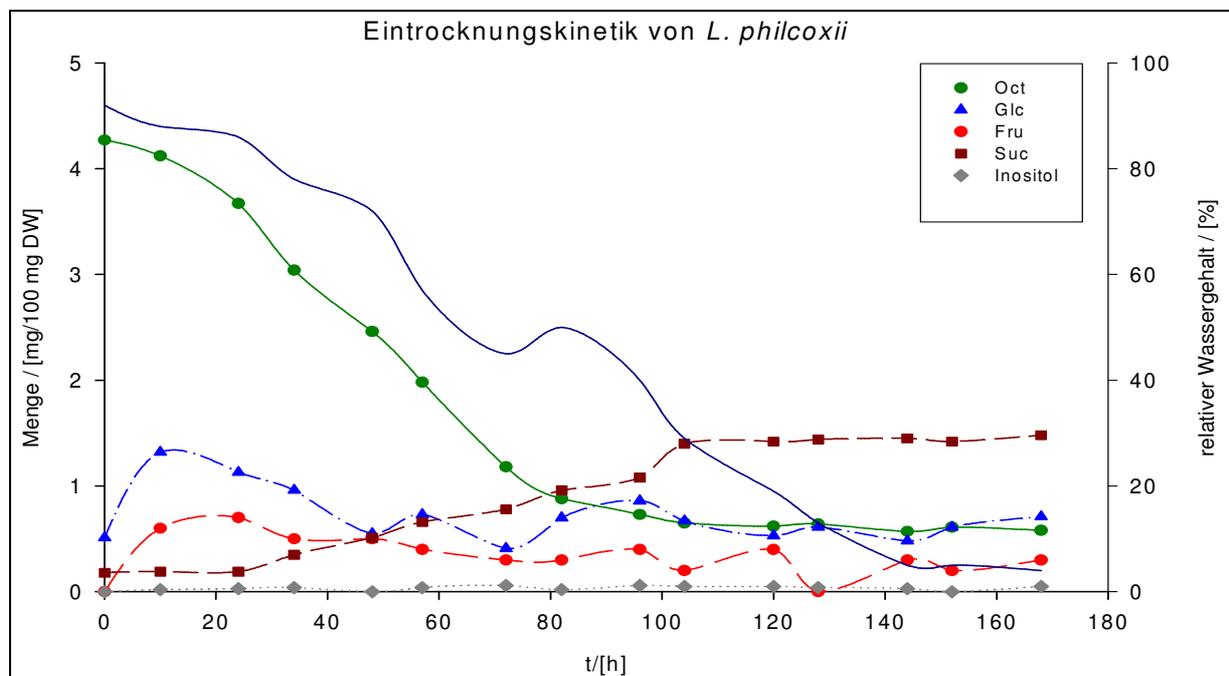


Abb.3-11: Veränderung im Zuckerhaushalt von *L. philcoxii* während der Eintrocknung.

3.2.4.4 *Lindernia brevidens*

2-D-glycero-D-ido-Oktulose macht bis zu 22% des Trockengewicht der unbehandelten Blätter von *L. brevidens* aus. Weiterhin konnten kleinere Mengen von Saccharose, Glukose und Fruktose detektiert werden (Abb. 3-12).



Während der Eintrocknungsphase wird ca. 80% der vorhandenen 2-D-glycero-D-ido-Oktulose metabolisiert und in fast gleichem Umfang wird Saccharose gebildet. Die Glukose- und Fruktose-

konzentrationen sind während der gesamten Eintrocknungsphase sehr gering. Sie machen über den gesamten Zeitraum nie mehr als 1 mg/100 mg DW aus. Weiterhin sind sowohl in unbehandelten als auch in getrockneten Blättern Spuren von Raffinose und Stachyose nachweisbar (Abb. 3-12).

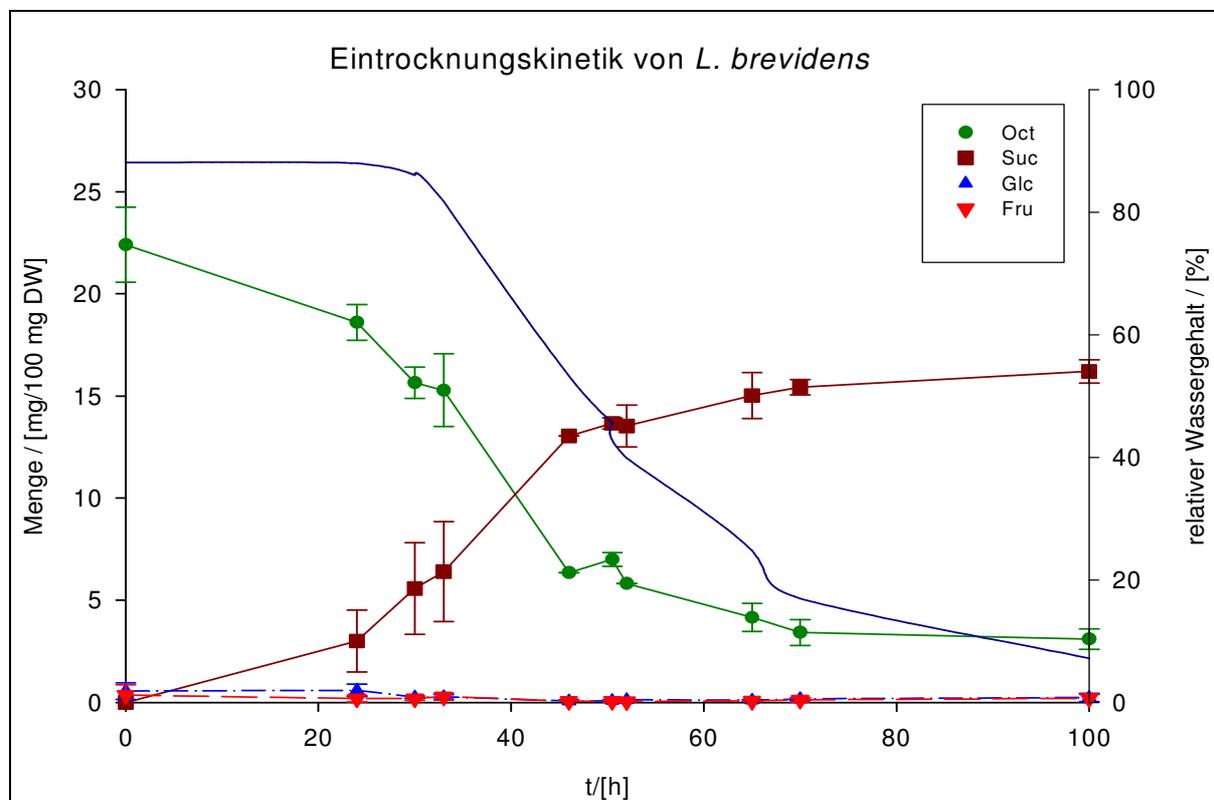


Abb.3-12: Veränderungen im Zuckerhaushalt von *L. brevidens* während der Eintrocknung. Für diese Kinetik wurden 2 Pflanzen verwendet.

L. brevidens konnte, im Gegensatz zu *L. philcoxii*, *L. rotundifolia* und *Crep. lactibracteatus*, nach einer fünftägigen absoluten Trockenheit erfolgreich wiederbewässert werden. Nach 24 h zeigte die Pflanze bereits wieder volle Turgeszenz und machte einen gesunden, funktionsfähigen Eindruck. Die Änderung der Konzentrationen der Zuckerkomponenten in den Blattgeweben wurde mittels GC/FID verfolgt (Abb.3-13). Während der Wiederbewässerung wird Saccharose abgebaut und in fast gleichen Gewichtsteilen 2-D-glycero-D-ido-Oktulose gebildet.

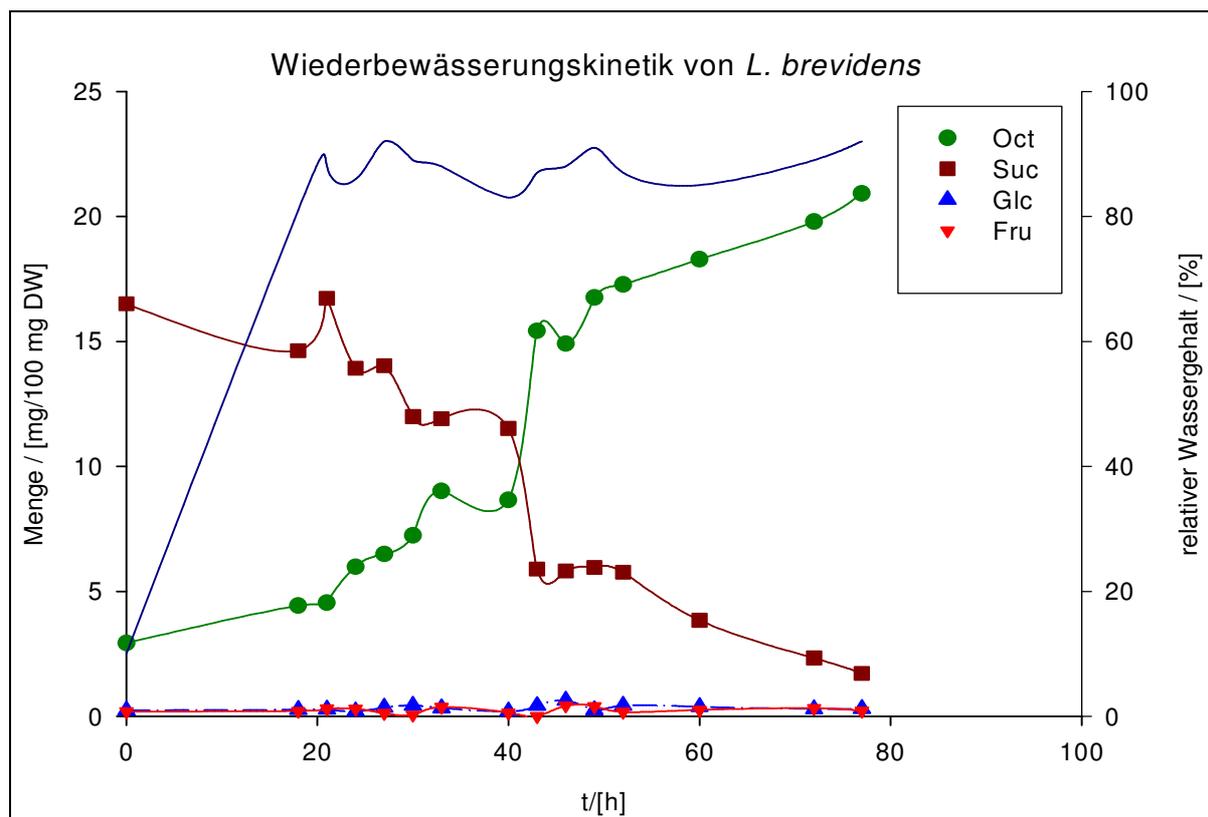
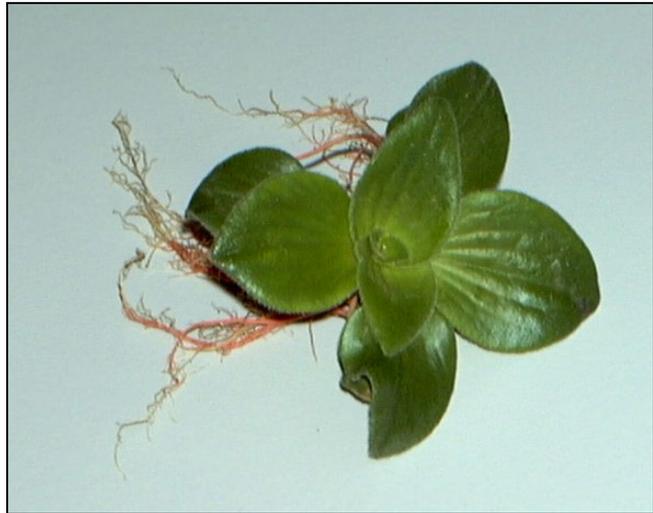


Abb.3-13: Veränderungen im Zuckerhaushalt von *L. brevidens* während der Wiederbewässerung.

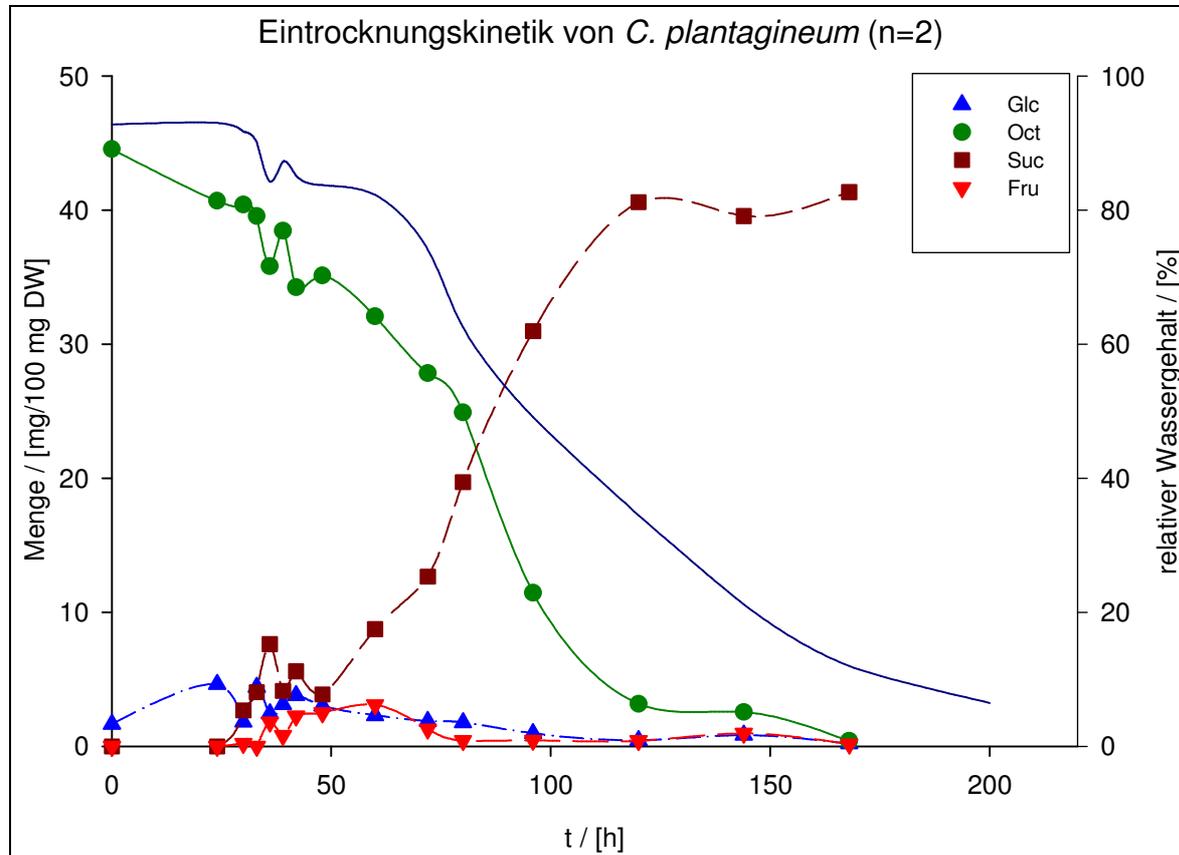
Drei Wochen nach erfolgter Wiederbewässerung wurden von Rahmanzadeh (2002) Vitalitätstests für die wiederbewässerten Pflanzen durchgeführt. Er konnte mittels Permeabilitätsmessungen, FDA-Färbung lebender Zellen und mikroskopischen Untersuchungen zur Zellstruktur zeigen, dass *L. brevidens* in der Lage ist, längere Zeiten völliger Trockenheit zu überleben. Die Pflanzen müssen jedoch mindestens 1 bis 2 Wochen völlig unter Wasser gehalten werden, bevor sie erfolgreich in Erde überführt werden können. In dieser Zeit wurde die Bildung neuer Wurzeln beobachtet, bereits vorhandene Wurzeln überstanden die Austrocknung nur begrenzt.

3.2.4.5 *Craterostigma plantagineum*

2-D-glycero-D-ido-Oktulose macht fast 45% des Trockengewichtes von unbehandelter Blätter von *C. plantagineum* aus. Während der Eintrocknungsphase kann auch, wie bei *L. brevidens*, die Metabolisierung von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose und die zeitgleich stattfindende Bildung von Saccharose beobachtet werden. In den Blättern von *C. plantagineum* kommt es zu Beginn der



Eintrocknungsphase zu einer kurzfristigen, deutlichen Erhöhung der Glukose- und Fruktosekonzentrationen. Für *C. plantagineum* wurden die Zuckerkonzentrationen einmal abhängig von der Zeit (Abb.3-14) und einmal vom relativen Wassergehalt aufgetragen (Abb.3-15).



Ab.3-14: Veränderungen im Zuckerhaushalt von *C. plantagineum* während der Eintrocknung.

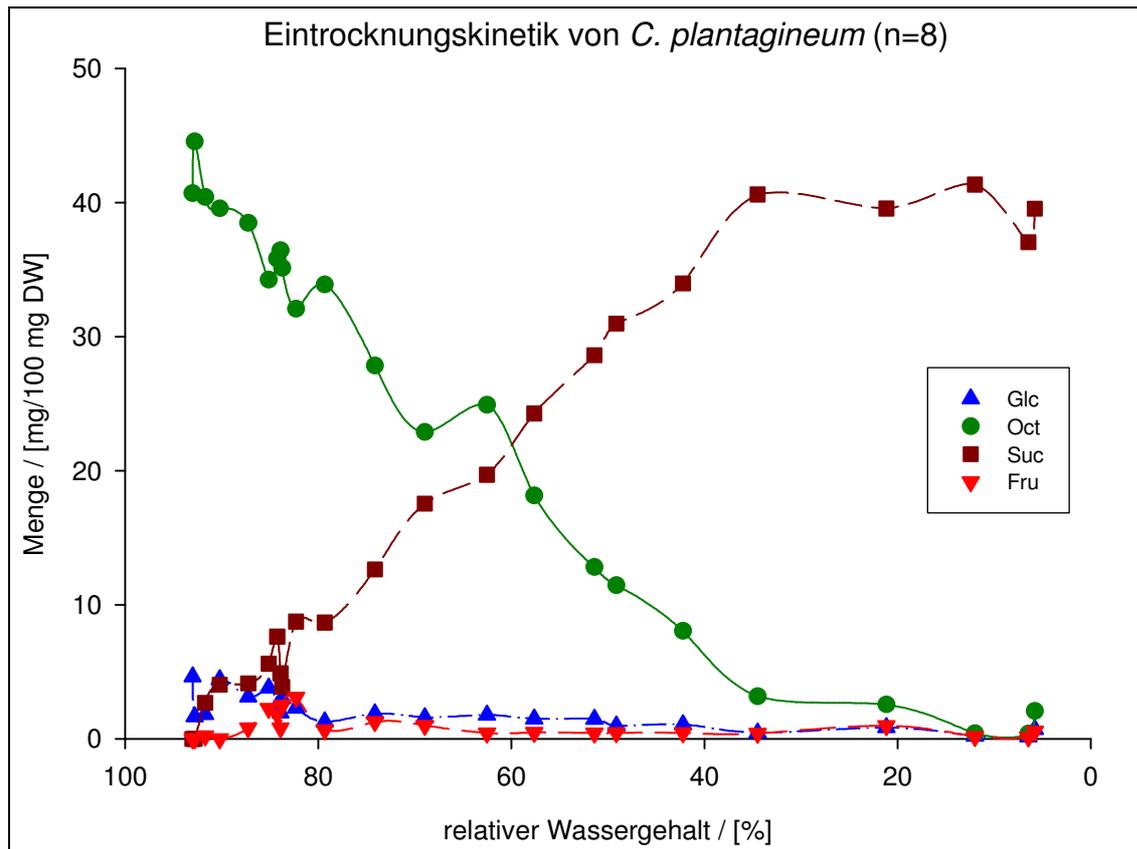


Abb.3-15: Veränderungen im Zuckerhaushalt in Blättern von *C. plantagineum* in Abhängigkeit vom relativen Wassergehalt.

Die Auftragung der Zuckermengen gegen den relativen Wassergehalt der Blätter ermöglicht bei *C. plantagineum* einen besseren Vergleich von eintrocknenden Pflanzen. Die verwendeten Pflanzen der untersuchten *Lindernia*-Arten und von *Crep. lactibracteatus* trocknen innerhalb ihrer Art unter gleichen Bedingungen nahezu gleichschnell aus. Die Größe der Pflanzen zeigt keinen großen Einfluss auf die Eintrocknungsrate. Aufgrund des Phänotyps von *C. plantagineum* ist die Austrocknungsrate in weit stärkeren Maße von der Größe der Pflanze, der vorhandenen Anzahl der Blätter und dem Verhältnis Wurzelgewebe zu Sprossgewebe abhängig. So ist bei den getesteten *Lindernia*-Arten und *Crep. lactibracteatus* die Masse des Wurzelgewebes gering im Verhältnis zur Masse des Sprossgewebes. Da die Zeitspanne in der verschiedene *C. plantagineum*-Pflanzen unter gleichen Versuchsbedingungen eintrocknen stark variiert, wurde eine Eintrocknungskinetik in Abhängigkeit vom relativen Wassergehalt der Blätter aufgenommen. Für die Kinetik wurden 8 verschiedene *C. plantagineum*-Pflanzen verwendet (Abb. 3-15). Für die Eintrocknungskinetik in Abhängigkeit von der Zeit wurden zwei gleich große Pflanzen mit der gleichen Blattzahl und ungefähr gleich großer Blattoberfläche verwendet (Abb. 3-14).

Unbehandelte Blätter von *C. plantagineum* weisen einen relativen Wassergehalt von 93% bis 89% auf. Zwischen 90% und 80% relativem Wassergehalt ist eine Konzentrationserhöhung der osmotisch aktiven Substanzen Glukose und Fruktose im Blattgewebe zu beobachten. Die Konzentration an 2-D-glycero-D-ido-Oktulose nimmt in diesem Zeitraum leicht ab. Unterhalb 80% relativen Wassergehalts ist eine verstärkte Synthese von Saccharose zu beobachten. In fast gleichem Maß wie Saccharose gebildet wird, nimmt die Konzentration an 2-D-glycero-D-ido-Oktulose ab. Unterhalb 30% relativen Wassergehaltes der Blätter ist keine Syntheseaktivität mehr zu beobachten.

C. plantagineum konnte nach einer 15-tägigen absoluten Trockenheit erfolgreich wiederbewässert werden. Nach 24 h zeigten die Pflanzen bereits wieder volle Turgeszenz und machten einen gesunden, funktionsfähigen Eindruck. Die Änderung der Konzentrationen der Zuckerkomponenten in den Blattgeweben wurde mittels GC/FID verfolgt (Abb.3-16). Während der Wiederbewässerung wird Saccharose abgebaut und in fast gleichen Gewichtsteilen 2-D-glycero-D-ido-Oktulose gebildet. Unabhängig von der Größe der Pflanzen oder der untersuchten Blätter erfolgt der Abbau der Saccharose und die Synthese von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose jeweils im gleichen Zeitrahmen (Abb. 3-16).

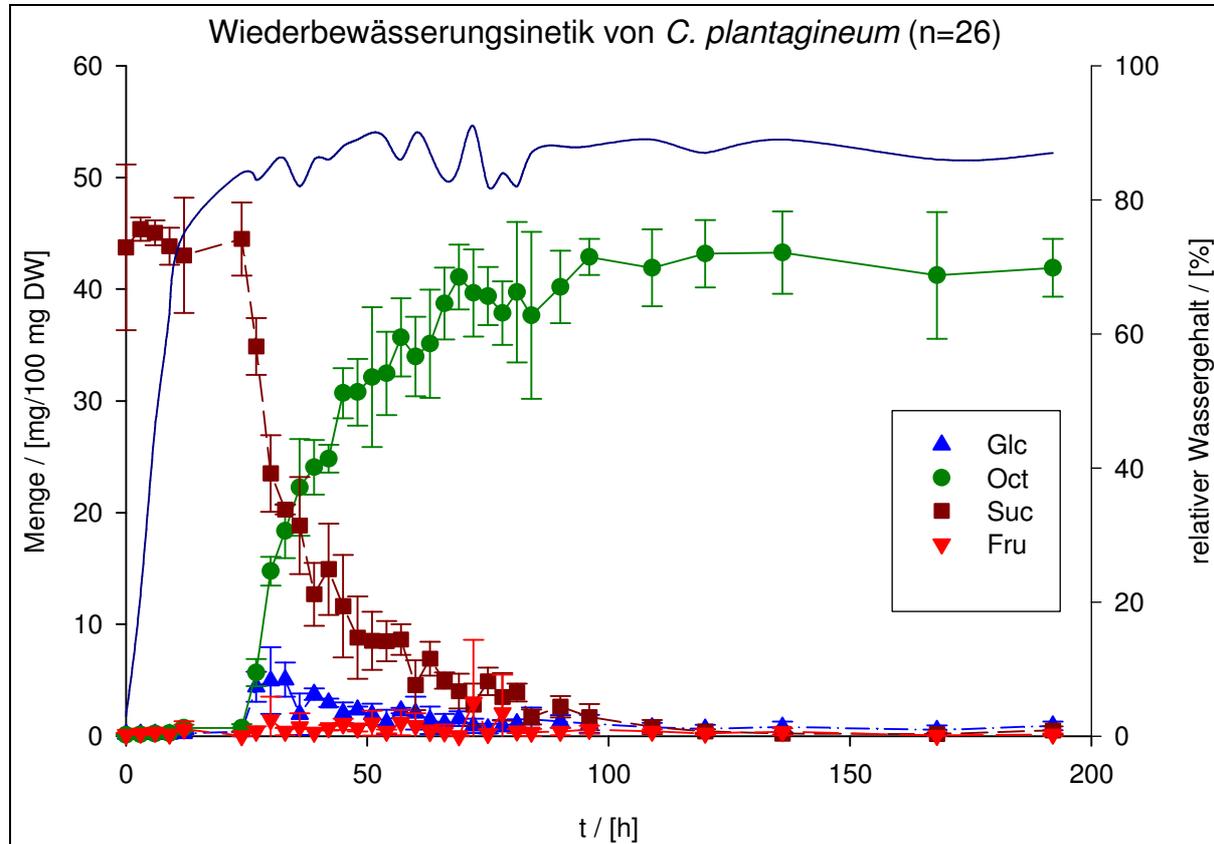


Abb.3-16: Veränderungen in den Zuckeranteilen in Blattgewebe von *C. plantagineum* während der Wiederbewässerung.

Drei Wochen nach erfolgter Wiederbewässerung wurden von Rahmanzadeh (2002) die bereits bei *L. brevidens* beschriebenen Vitalitäts-Tests durchgeführt. Es konnte auch für *C. plantagineum* gezeigt werden, dass die Pflanze in der Lage ist, Trockenheit zu überleben. Im Gegensatz zu *L. brevidens* reicht es aus, *C. plantagineum* für 24 bis 48 Stunden komplett unter Wasser zu rehydrieren. Die Pflanze kann dann in Erde überführt werden.

3.3 Verfolgung der Metabolisierung von Saccharose und Glukose durch radioaktive Markierung

3.3.1 Experimente mit ^{14}C -u-Saccharose

Um zu zeigen, dass es sich bei 2-D-glycero-D-ido-Oktulose um die Speicherform von Saccharose handelt, wurden Wiederbewässerungsexperimente mit radioaktiv markierter ^{14}C -u-Saccharose-Lösung durchgeführt. In Vorexperimenten wurde die aufgenommene Radioaktivität während der Wiederbewässerungsphase bestimmt. In den ersten 12 h der Wiederbewässerung wurden ca. 8% der eingesetzten Radioaktivität von den Pflanzen aufgenommen. Um eine möglichst hohe, spezifische Radioaktivität von Saccharose in den Pflanzen zu gewährleisten, wurde das Volumen der Wiederbewässerungslösung so gering wie möglich gehalten (2.2.1.3). Nach 12 h, bevor es zu einer Veränderung im Zuckerhaushalt der wiederbewässerten Pflanzen kommt, wurde die radioaktive Saccharose-Lösung gegen Gießwasser ausgetauscht. Nach definierten Zeiten wurden Zuckerextraktionen aus Blatt- und Wurzelgewebe durchgeführt. Mittels HPLC wurden die Zuckerkomponenten fraktioniert gesammelt und die Radioaktivität der einzelnen Komponenten mittels Szintillationszähler bestimmt (2.2.7).

3.3.1.1 Verteilung von radioaktiv markierten Substanzen im Blattgewebe

Während der Wiederbewässerung zwischenzeitlich auftretende, größere Mengen an Fruktose und Glukose wiesen beide eine radioaktive Markierung auf. Da die beiden Monosaccharide von der verwendeten Carbo-Pac-PA100-Säule zu nah nacheinander eluieren, um eine Trennung der Radioaktivitätsverteilung durchführen zu können, wurde die Radioaktivität der beiden Substanzen zusammen angegeben.

Die Migration der von der Pflanze aufgenommenen Radioaktivität wurde mit der Wiederbewässerungskinetik von *C. plantagineum* verglichen (Abb.3-17). Wie aus Abb. 3-17

ersichtlich wandert fast die gesamte Radioaktivität von der markierten Saccharose innerhalb von ca. 80 h zur 2-D-glycero-D-ido-Oktulose.

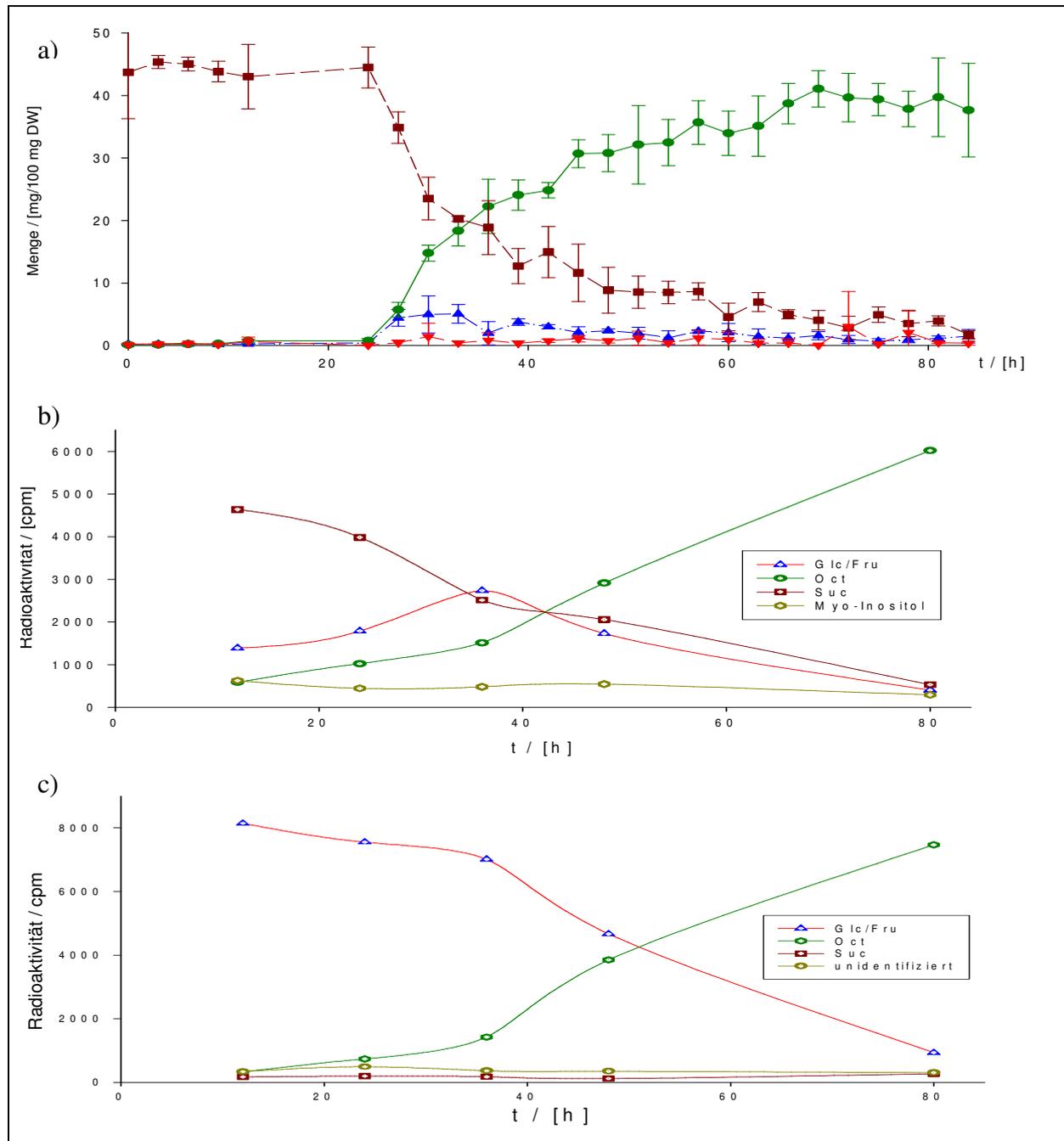


Abb.3-17: Veränderungen im Zuckerhaushalt von *C. plantagineum* während der Wiederbewässerung (a) und Migration der Radioaktivität von ^{14}C -u-Saccharose (b), bzw. ^{14}C -u-Glukose (c), zu 2-D-glycero-D-ido-Oktulose.

Ein Vergleich der Migrationsgeschwindigkeit mit dem Abbau von Saccharose bzw. der Bildung von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose lässt auf eine schnelle, einfache und fast völlige Umwandlung von Saccharose in 2-D-glycero-D-ido-Oktulose während der Wiederbewässerungsphase schließen.

Zwischen 22 h und 37 h Wiederbewässerung ist ein Anstieg in der Radioaktivität von Glukose und Fruktose zu beobachten, der zeitgleich mit einem Anstieg der Glukose- und Fruktosekonzentrationen im Blattgewebe von *C. plantagineum* einhergeht. Sowohl die Zuckerkonzentrationen als auch die spezifische Radioaktivität dieser beiden Monosaccharide sinkt später wieder ab (Abb. 3-17).

Mehr als 85% der eingesetzten Radioaktivität konnte nach 80 h in der gebildeten 2-D-glycero-D-ido-Oktulose wiedergefunden werden. Die restlichen 15% der Radioaktivität verteilten sich hauptsächlich auf Radioaktivität aus Saccharose, Glukose und Fruktose. Ca. $\frac{1}{4}$ dieser Radioaktivität eluierte bereits nach 1 min. von einer Carbo-Pac-PA100-Säule. Durch einen Vergleichsstandard, der über die Säule gegeben wurde und dünnschichtchromatographische Untersuchungen (2.2.3) wurde die radioaktive Substanz als Myo-Inositol identifiziert.

Das Pellet der methanolischen Zuckerextraktion wurde einer Chloroformextraktion unterzogen und der Überstand auf Radioaktivität überprüft. Die detektierte Radioaktivität entsprach lediglich 0,6 % der Gesamtradioaktivität der methanolischen Phase. Innerhalb der ersten 80 h der Wiederbewässerung wird Saccharose fast ausschließlich zu 2-D-glycero-D-ido-Oktulose metabolisiert.

Wiederbewässerungsexperimente mit ^{14}C -u-Glukose-Lösung ergaben, analog zu Wiederbewässerungsexperimenten mit ^{14}C -u-Saccharose, eine Migration der Radioaktivität von der eingesetzten, markierten Substanz hin zur 2-D-glycero-D-ido-Oktulose. Auch hier konnte nach 80 h über 85% der eingesetzten Radioaktivität in 2-D-glycero-D-ido-Oktulose wiedergefunden werden (Abb. 3-17).

3.3.1.2 Verteilung der radioaktiv markierten Substanzen im Wurzelgewebe

Untersuchungen von Wurzelgewebe zeigte neben einer Aufnahme von radioaktiver Saccharose innerhalb der ersten 12 h der Wiederbewässerung einen mit der Zeit zunehmenden Einbau der Radioaktivität in zwei Zucker der Raffinoseserie: Raffinose (Gal(α 1-6)Suc) und Stachyose (Gal(α 1-6)Gal(α 1-6)Suc). Stachyose, Saccharose und Raffinose sind die Hauptzuckerkomponenten im Wurzelgewebe von *C. plantagineum* (Abb.3-18).

Zwischen 24 h und 40 h ist ein leichter Anstieg der Radioaktivität in Glukose und Fruktose zu beobachten. Die radioaktiv markierten Monosaccharide werden dann ab 40 h bis 80 h kontinuierlich wieder abgebaut. Im Gegensatz zur Umwandlung von Saccharose zu 2-D-glycero-D-ido-Oktulose in Blättern von *C. plantagineum* ist keine signifikante Übertragung der Radioaktivität von Saccharose auf 2-D-glycero-D-ido-Oktulose in Wurzeln

zu beobachten. Es konnte auch keine größere Verlagerung der Radioaktivität vom Wurzelgewebe in das Blattgewebe beobachtet werden. Es scheint, dass die vom Wurzelgewebe aufgenommene Saccharose direkt im Wurzelgewebe gespeichert wird. Weiterhin ist nach ca. 40 h Wiederbewässerung der Beginn des Einbaus von Saccharose in die Oligosaccharide der Raffinose-Serie zu beobachten.

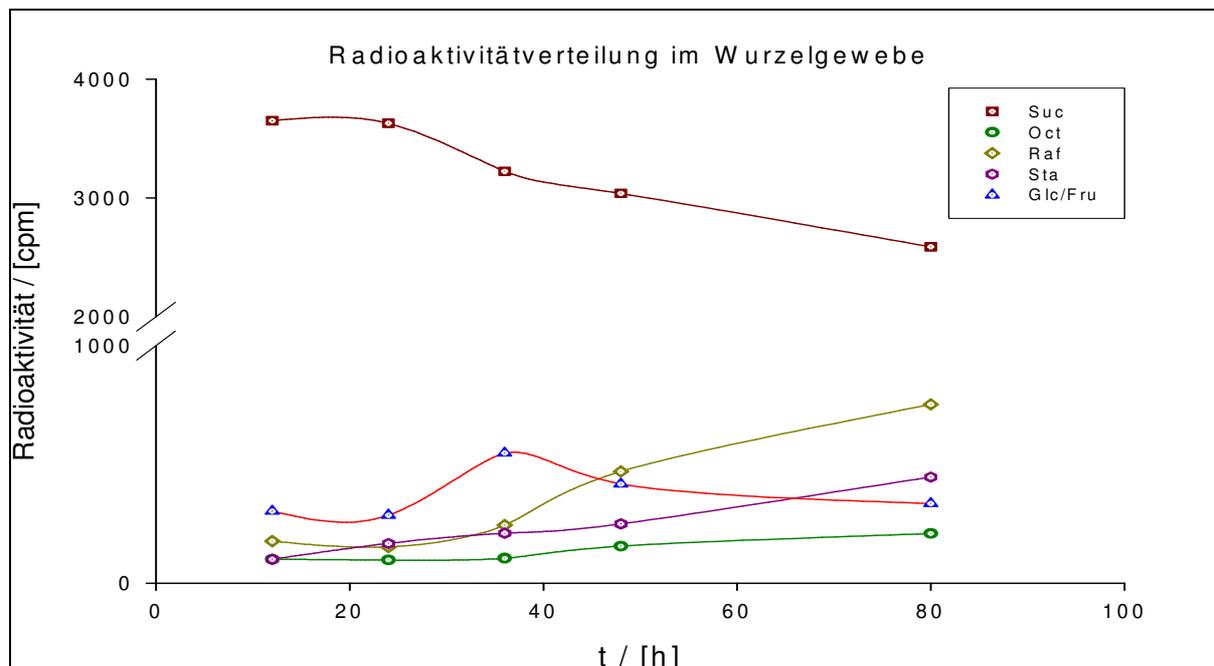


Abb.3-18: Radioaktivitätsverteilung in Wurzeln von *C. plantagineum* während der Rehydrierung.

3.3.2 Experimente mit ^{14}C -6-Glukose

Ein Exemplar *C. plantagineum* wurde eingetrocknet und mit einer ^{14}C -6-Glukose-Lösung rehydriert. Nach 80 h wurden die Blätter der Pflanze einer methanolischen Zuckerextraktion unterworfen. Mittels GC/MS wurde die Verteilung der Radioaktivität in der gebildeten 2-D-glycero-D-ido-Oktulose untersucht. Ein MS-Chromatogramm der zum Teil aus radioaktiv markierter Saccharose gebildeten 2-D-glycero-D-ido-Oktulose wurde mit einem MS-Chromatogramm eines 2-D-glycero-D-ido-Oktulosestandards (3.1) und dem MS-Chromatogramm von aus *C. plantagineum* isolierter 2-D-glycero-D-ido-Oktulose verglichen (Abb.3-19 und 3.20). Die Isotopenverteilung der MS-Fragmente, die eine ^{14}C -markierte Position aufweisen, sollte sich von der natürlichen Isotopenverteilung unterscheiden.

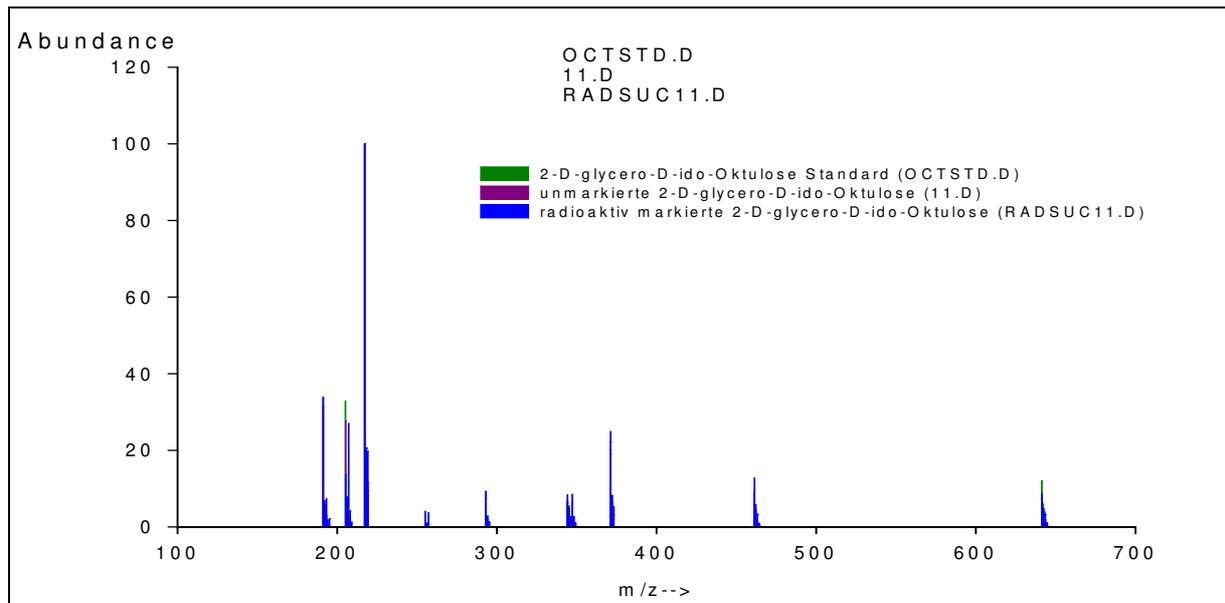


Abb.3-19: Auf das Fragment m/z 217 genormte MS-Chromatogramme zweier 2-D-glycero-D-ido-Oktulosestandards und einer ^{14}C -markierten 2-D-glycero-D-ido-Oktuloseprobe.

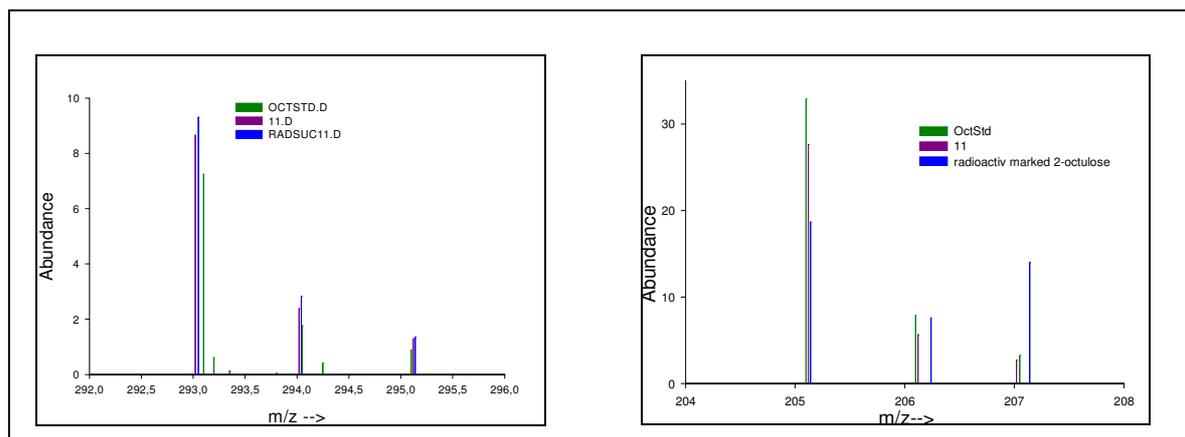


Abb.3-20: Ausschnitte der Chromatogramme aus Abb. 3-19. Zu sehen sind die Isotopenverteilungen der Massefragmente m/z 293 und m/z 205. Das Fragment m/z 205, das hauptsächlich aus den Positionen C7 und C8 besteht, zeigt eine deutliche Steigerung in der Intensität des M+2-Peaks. Das Fragment m/z 293 enthält hauptsächlich die Positionen C1 und C2. Es ist keine Veränderung in der natürlichen Isotopenverteilung zu beobachten.

Das Massefragment m/z 293, das ausschließlich aus den Positionen C1 und C2 besteht (Irvine et al., 1992), zeigt keine Veränderung in seiner natürlichen Isotopenverteilung. Bei dem Massefragment m/z 205, das zu über 35 % aus den Positionen C7 und C8 (Irvine et al., 1992) besteht, ist eine deutliche Intensitätssteigerung des M+2-Peaks zu sehen, was auf eine radioaktive Markierung einer der beiden Positionen hinweist. Die Massefragmente m/z 372 und m/z 461 und m/z 641, die ebenfalls die Positionen C7 und C8 enthalten, zeigen ebenfalls eine Intensitätssteigerung des M+2-Peaks. Da diese Massefragmente jedoch sechs unmarkierte C-Atome enthalten und neben der markierten 2-D-glycero-D-ido-Oktulose von der

Pflanze auch unmarkierte 2-D-glycero-D-ido-Oktulose gebildet wird, ist die Veränderung im Isotopenverhältnis geringer.

3.3.3 Experimente mit ^{14}C -1-Glukose

Unter gleichen Bedingungen wie unter 3.3.2 beschrieben, wurde eine *C. plantagineum*-Pflanze mit ^{14}C -1- Glukose-Lösung inkubiert und die Position der ^{14}C -Markierung in der 2-D-glycero-D-ido-Oktulose mittels Massenspektrometrie bestimmt.

Untersuchungen radioaktiv markierter Phosphatzucker (siehe 3.5) zeigten keinen Hinweis auf eine radioaktive Markierung von Arabinose-5-P (Ara-5-P) in *C. plantagineum*. Ara-5-P ist das benötigte Akzeptorsubstrat einer Aldolase- oder Transaldolasereaktion.

Im Fall einer Transketolasereaktion mit ^{14}C -1-Glc-6-P als Akzeptorsubstrat sollte eine radioaktive Markierung der C3-Position der gebildeten 2-D-glycero-D-ido-Oktulose zu beobachten sein. Es gibt mehrere Massefragmente, die diese Position beinhalten und somit eine Intensitätserhöhung ihres M+2-Peaks aufweisen sollten. Die Intensitätserhöhung der relevanten M+2-Peaks wurde gefunden. Sie waren jedoch nicht so eindeutig wie die Markierung der C8-Position in Versuch 3.3.2 (Abb. 3-21 und 3-22).

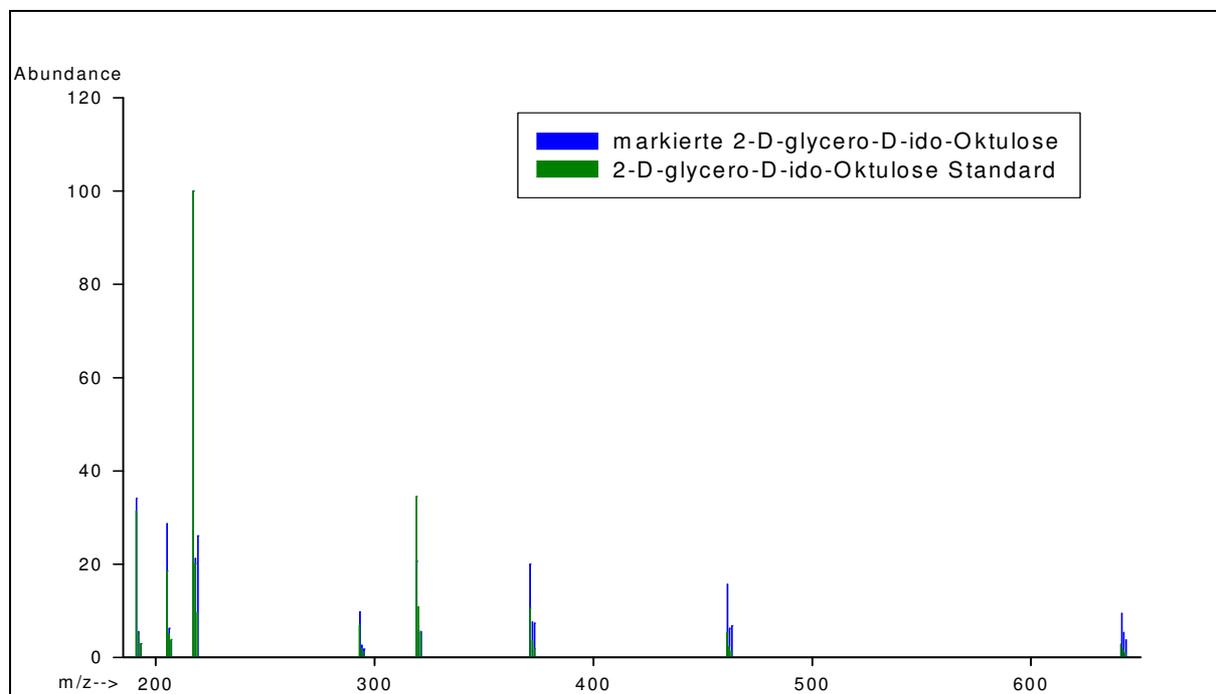


Abb.3-21: Zwei auf die Massepeaks m/z 217 genormten MS-Chromatogramme eines unmarkierten 2-D-glycero-D-ido-Oktulosestandards und einer radioaktiv markierten 2-D-glycero-D-ido-Oktuloseprobe einer mit ^{14}C -1-Glukoselösung wiederbewässerten Pflanze.

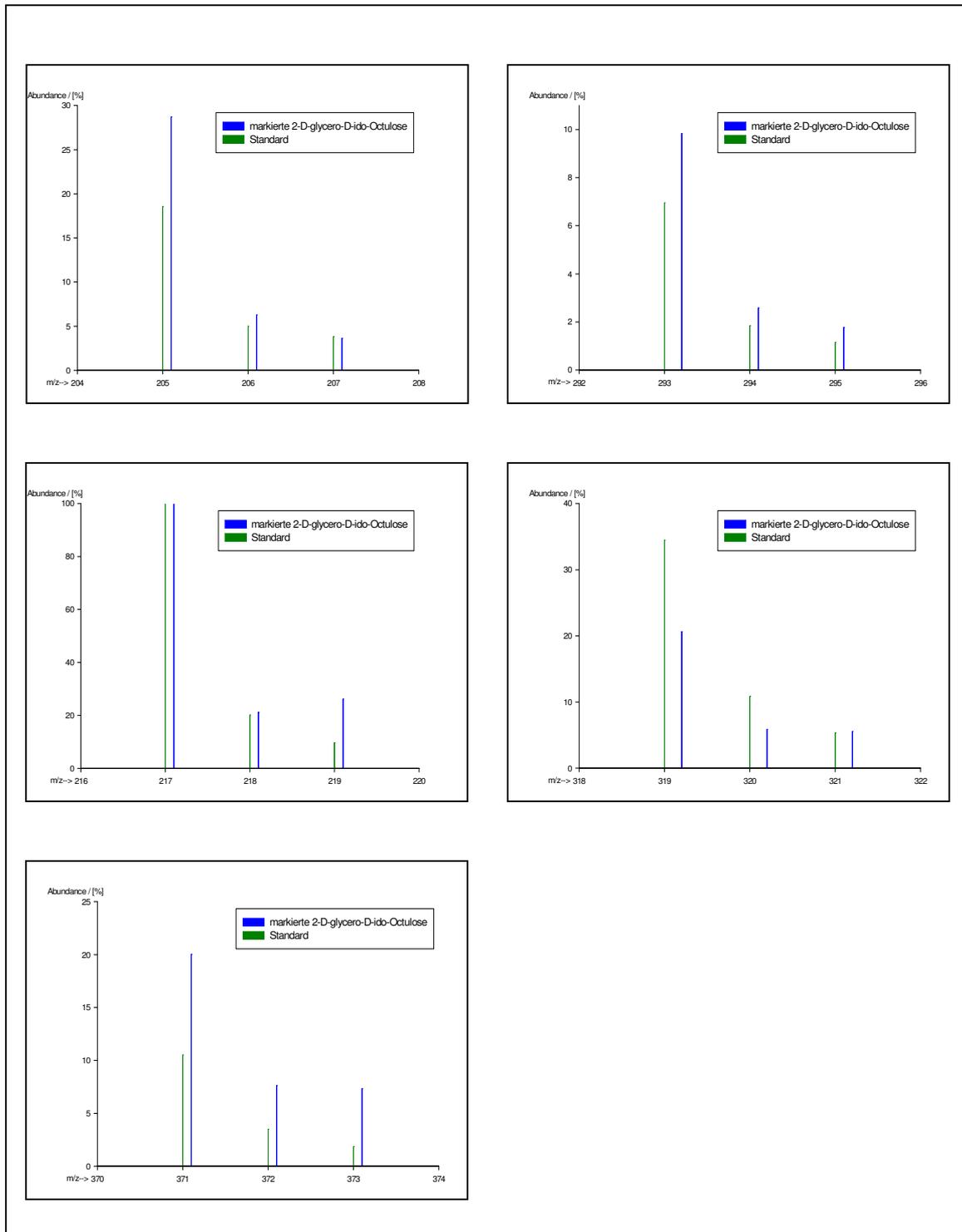


Abb.3-22: Das Fragment m/z 205 enthält fast ausschließlich Position C7 und C8 der 2-D-glycero-D-ido-Oktulose, das Fragment m/z 293 hingegen die C1 und C2 Position. Bei beiden Fragmenten ist keine signifikante Veränderung in der natürlichen Isotopenverteilung zu beobachten. Bei Massefragmenten, die die Positionen C3 bis C6 enthalten (Irvine et al., 1992), ist eine Intensitätssteigerung des M+2 Peaks zu beobachten. Als Beispiele sind hier die Intensitätsverteilungen der Massefragmente m/z 217, 319 und 371 abgebildet.

Die in Abb. 3-22 gezeigten Erhöhungen der M+2-Massenpeaks bestimmter Massefragmente von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose wurde durch den Vergleich der gemittelten Intensitätsverhältnisse M+2/M und M+2/M+1 spezifischer MS-Fragmente von 19 MS-Chromatogrammen verschiedener, unmarkierter 2-D-glycero-D-ido-Oktulosestandards und 9 MS-Chromatogrammen von radioaktiv markierten 2-D-glycero-D-ido-Oktuloseproben untermauert (Abb. 3-23).

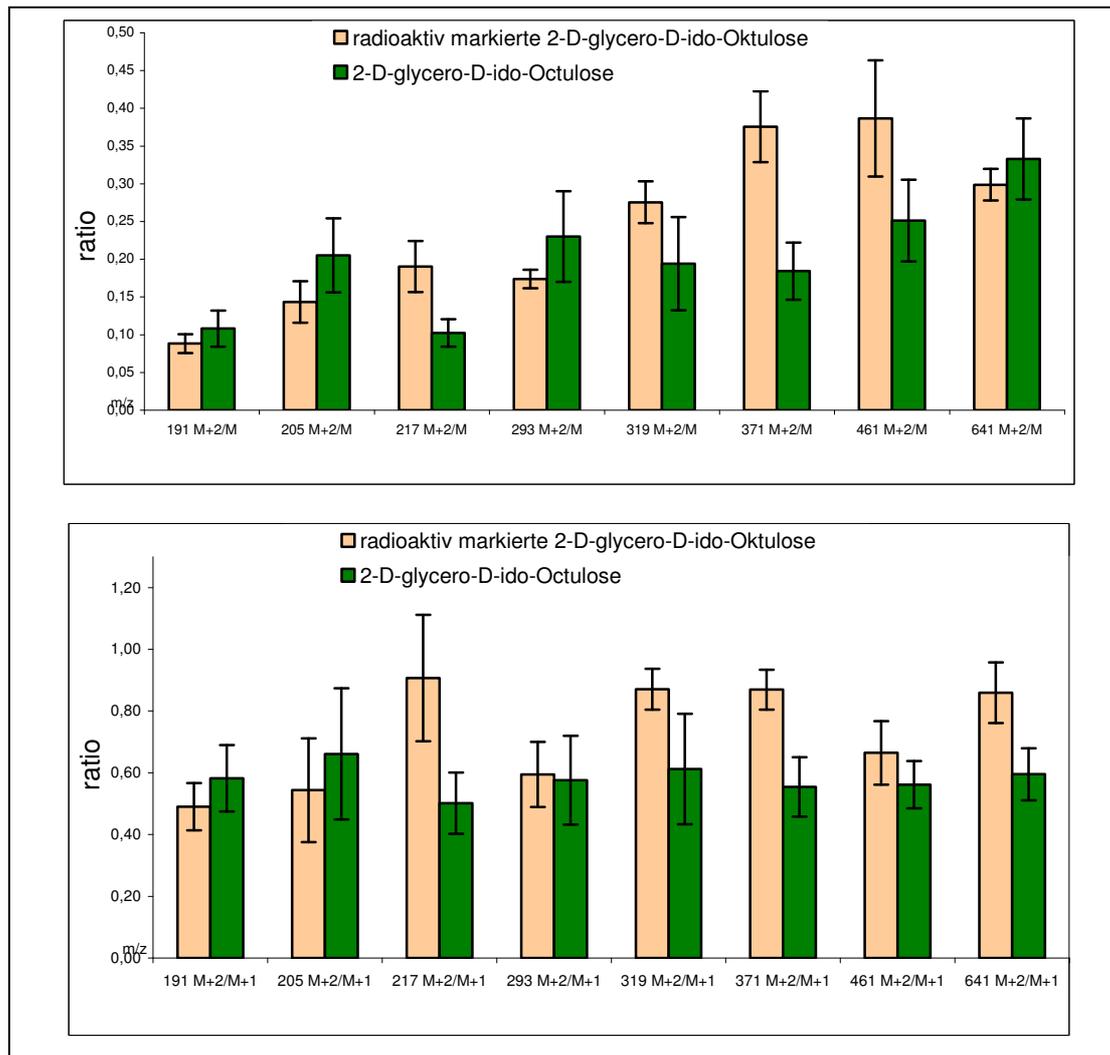


Abb.: 3-23: Gemittelte Intensitätsverhältnisse von M+2-Massenpeaks und M bzw. M+1 spezifischer Massefragmente. Die Fragmente m/z 217, 319, 371, 461 und 641 enthalten die C3-Position.

Wie aus Abb.3-23 ersichtlich, weisen Massefragmente, die Positionen C3 und C4 enthalten, eine signifikante Intensitätserhöhung der M+2-Massenpeaks auf. Fragmente, die hauptsächlich Position C1 und C2 (m/z 293) bzw. C7 und C8 (m/z 205) beinhalten, zeigen hingegen keine signifikante Veränderung in der natürlichen Isotopenverteilung.

3.4 Radioaktivitätsverteilung während der Dehydrierung von *Craterostigma plantagineum*

Eine *C. plantagineum*-Pflanze wurde getrocknet und mit ^{14}C -u-Saccharose-Lösung wiederbewässert (siehe 3.3.1). Nach 80 h Rehydrierung wurde die Pflanze wieder eingetrocknet. Bei 90%, 67%, 26% und 7% relativem Wassergehalt wurde Blattmaterial einer methanolischen Zuckerextraktion unterworfen, die einzelnen Neutralzucker mittels HPLC getrennt und die Radioaktivität in den einzelnen Komponenten bestimmt.

Ein Vergleich der Migration in Abhängigkeit von dem relativem Wassergehalt des Gewebes mit den Konzentrationen der Zuckerkomponenten in Blättern von *C. plantagineum* in Abhängigkeit vom relativem Wassergehalt zeigte, dass 2-D-glycero-D-ido-Oktulose oder zumindest ein großer Teil der 2-D-glycero-D-ido-Oktulosemenge aus unbehandelten Blättern im Fall der Dehydrierung in Saccharose umgewandelt wird (Abb. 3-24).

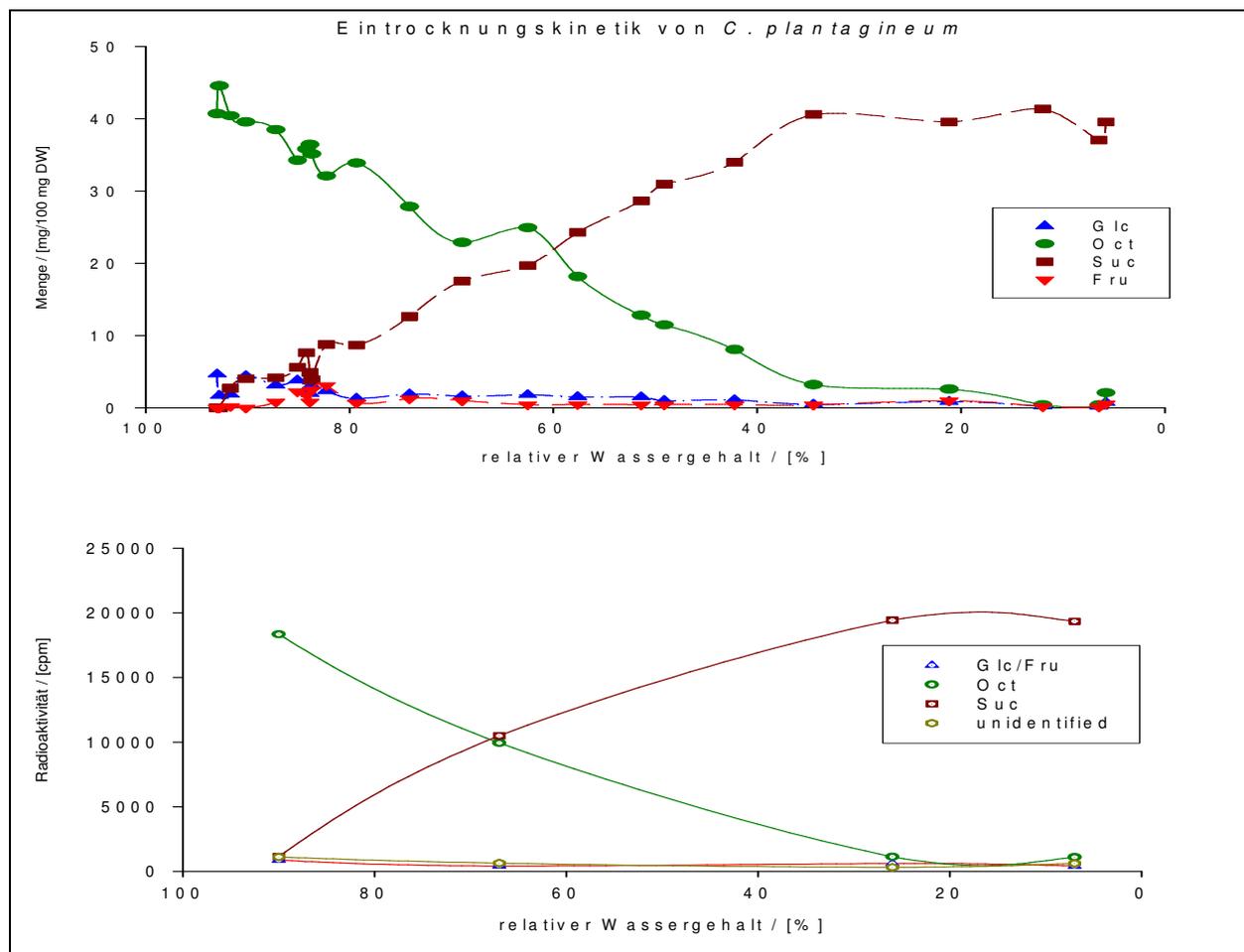


Abb. 3-24: Migration von Radioaktivität von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose zu Saccharose in Blättern von *C. plantagineum* unter Trockenstress.

3.5 Identifizierung von radioaktiven Intermediärprodukten der 2-D-glycero-D-ido-Oktulosesynthese während der Wiederbewässerung von *Craterostigma plantagineum*

Zur Bestimmung von Intermediärprodukten des Zuckerstoffwechsels von *C. plantagineum* wurden zwei Pflanzen mit ^{14}C -u-Saccharose wiederbewässert. Nach 52 h Wiederbewässerung wurden die Blätter einer Phosphatzuckerextraktion unterzogen (2.2.2.2.1). Nach der Entfernung hydrophober und kationischer Substanzen, wurde die Lösung mit Phosphatzuckern zur Abtrennung von Chlorid, Zuckern, Aminosäuren und Phytin und zur Auftrennung der einzelnen Phosphatzucker über eine DEAE-Cellulose-Säule gegeben. Die Radioaktivität der gesammelten 10 ml Fraktionen wurde bestimmt und die Retentionszeiten der markierten Substanzen mit wichtigen Phosphatzuckern verglichen (Abb.3-25).

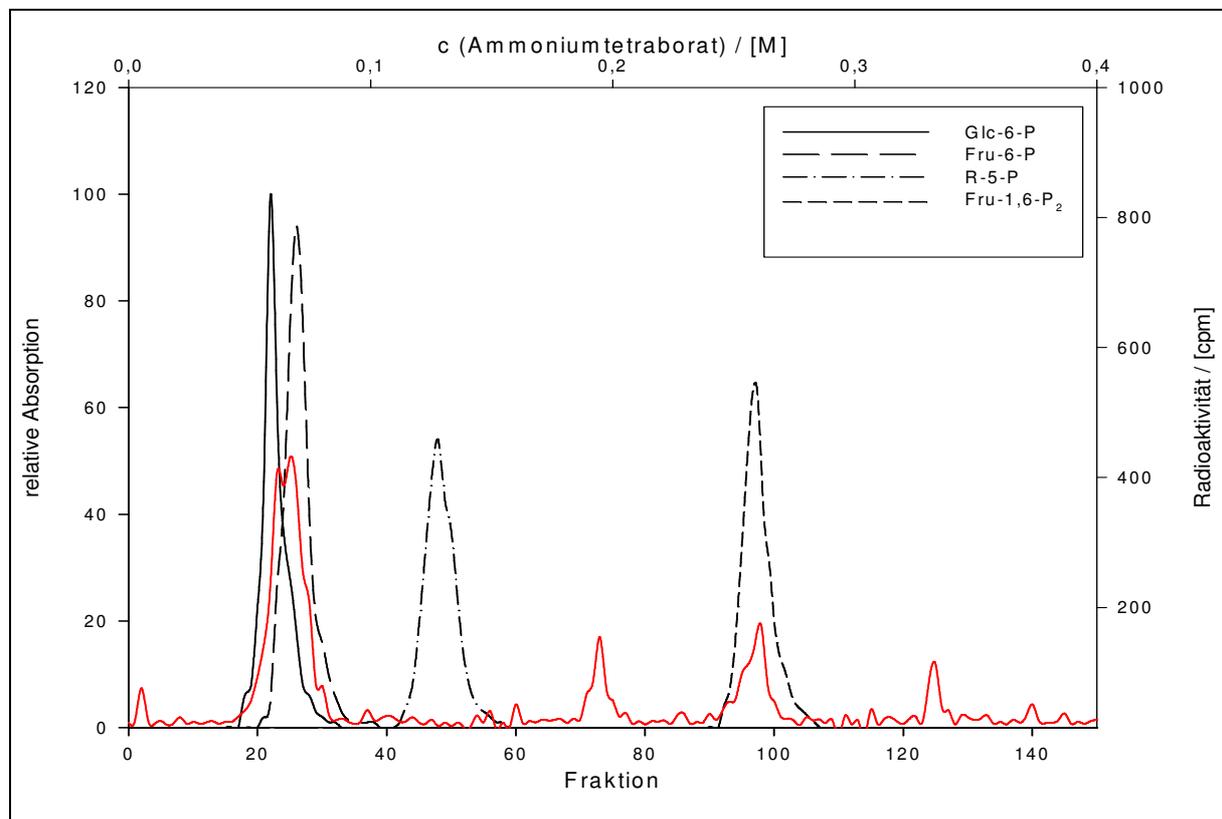


Abb.3-25: Elution von nach 52 h Wiederbewässerung extrahierten, radioaktiv markierten Phosphatzuckern von einer DEAE-Cellulose-Säule und Vergleich der Retentionszeiten mit den Retentionszeiten von Phosphatzuckerstandards.

Die aufgereinigten radioaktiven Substanzen wurden zur weiteren Untersuchung einer zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie unterzogen (2.2.4). Die auf die Dünnschichtplatten aufgetragene Radioaktivität aus Phosphatzuckerextraktionen nach 26 h und 52 h Wiederbewässerung betrug jeweils $0,05 \mu\text{Ci}$. Nach dem zweidimensionalen Lauf

wurden Filme für 12 Tage auf den DC-Platten exponiert und entwickelt. Die R_f -Werte von Standards wurden mit den Positionen der durch Radioaktivität geschwärzten Stellen auf den Filmen verglichen (Tab.3-4 und Abb. 3-26):

Tab.3-4: R_f -Werte verschiedener Phosphatzucker.

Substanz	R_f (GW3 [*])	R_f (GW3-PBA)	Kohlenstoffgerüst
R-5-P	0,47	0,82	5
Ara-5-P	0,6	0,66	5
Glc-6-P	0,37	0,39	6
Fru-6-P	0,45	0,46	6
Fru-1,6-P ₂	0,34	0,34	6
Sed-7-P	0,42	0,51	7
Oct-8-P ^{**}	0,39	0,78-0,53 ^{***}	8

* GW3 ist ein Gemisch aus n-Butanol : n-Propanol : Aceton : 20% (w/v) Ameisensäure : 30% (w/v) Trichloressigsäure (40:20:25:25:15)

** 2-D-glycero-D-ido-Oktulose-8-P wurde zusammen mit Glc-6-P aus den Reaktionsansätzen von 3.5.3.2.1 isoliert und aufgetragen

*** 2-D-glycero-D-ido-Oktulose-8-P zeigt bei Zugabe von 2,5 % Phenylboronsäure einen langen, verwaschenen „Spot“

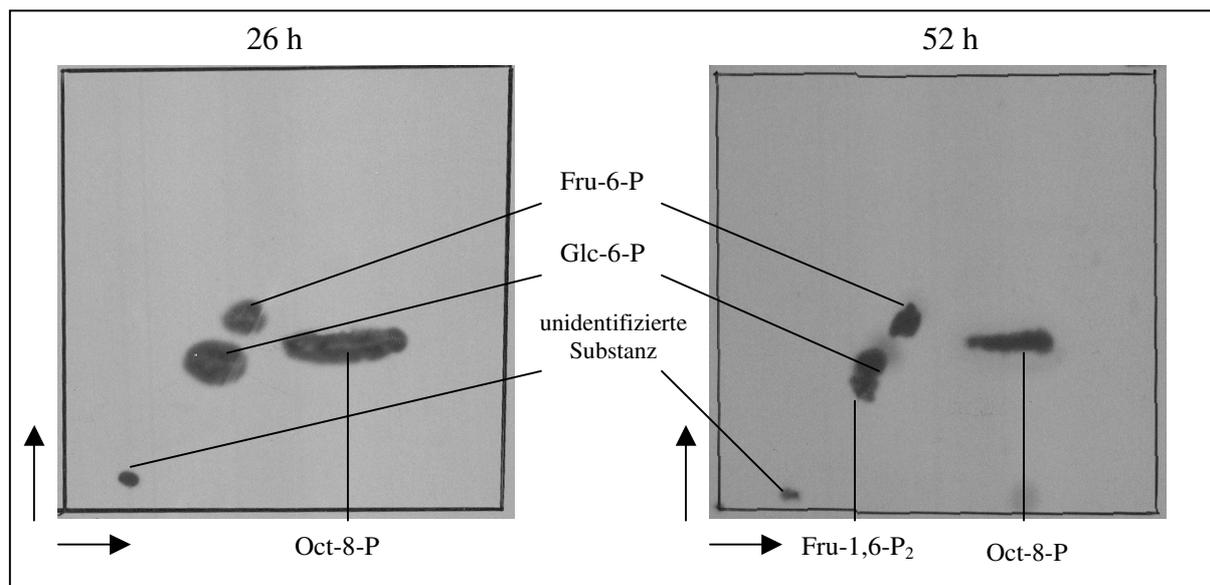


Abb.3-26: Radioaktivitätsverteilung von Phosphatzucker bei einer zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie. Extrahierte Phosphatzucker aus *C. plantagineum* wurden zusammen mit Phosphatzuckerstandards auf eine cellulosebeschichtete Glasplatten aufgetragen. Es konnte gezeigt werden, dass Glc-6-P, Fru-6-P, Fru-1,6-P₂ und Oct-8-P eine radioaktive Markierung aufweisen.

Eine radioaktiv markierte Substanz mit R_f -Werten von 0,08 und 0,23 konnte keinem Phosphatzuckerstandard zugeordnet werden.

3.6 Enzymatische Untersuchungen zur Konvertierung von Saccharose in 2-D-glycero-D-ido-Oktulose während der Wiederbewässerung

3.6.1 Relative Enzymaktivität von Transketolase und Aldolase aus *Craterostigma plantagineum* während der Wiederbewässerung

Wie aus den Wiederbewässerungskinetiken von Neutralzuckern aus *C. plantagineum* ersichtlich, kommt es zwischen 24 h und 72 h nach Beginn einer Wiederbewässerung in den Pflanzen zu einer Konvertierung von Saccharose in 2-D-glycero-D-ido-Oktulose. Die Transketolaseaktivität (bezogen auf R-5-P und Xu-5-P) und die Aldolaseaktivität (bezogen auf Fru-1,6-P₂) wurde zu verschiedenen Wiederbewässerungszeiten bestimmt und in Abhängigkeit von der Trockenmasse des verwendeten Pflanzenmaterials angegeben (Abb.3-27). Die Aktivitäten wurden, wie unter 2.2.11 beschrieben, bestimmt.

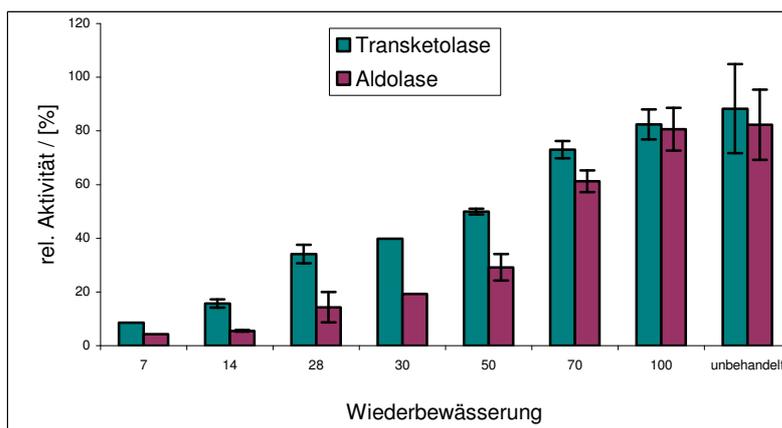


Abb.3-27: Relative Enzymaktivitäten von Transketolasen und Aldolasen in Blattgewebe von *C. plantagineum* während der Rehydrierungsphase bezogen auf die extrahierte Biomasse.

3.6.2 Aufreinigung von Transketolase aus *Craterostigma plantagineum*

Die Aufreinigung von Transketolase aus *C. plantagineum* erfolgte nach den unter 2.4.1 beschriebenen Methoden. Transketolase präzipitiert zwischen 55% und 75% (NH₄)₂SO₄-Sättigung (0 °C). Eine weitere Aufreinigung erfolgte über eine Anionenaustauscher-Chromatographie (DEAE-Cellulose). Aktive Transketolase konnte hier bei pH 8,1 mit 0,1-0,16 M NaCl eluiert werden (Abb.3-28). In einem letzten Aufreinigungsschritt über eine Mono-Q-Säule eluierte Transketolase bei pH 8,15 in zwei Fraktionen zwischen 0,1-0,2 M NaCl (Abb. 3-29). Der Nachweis von Transketolase in den einzelnen Fraktionen erfolgte immunologisch (2.2.9). Es wurde Transketolase aus unbehandelten und aus 28 h

wiederbewässerten Blättern isoliert. Die folgende Aufreinigung zeigt die Isolierung von Transketolase aus wiederbewässerten Pflanzen.

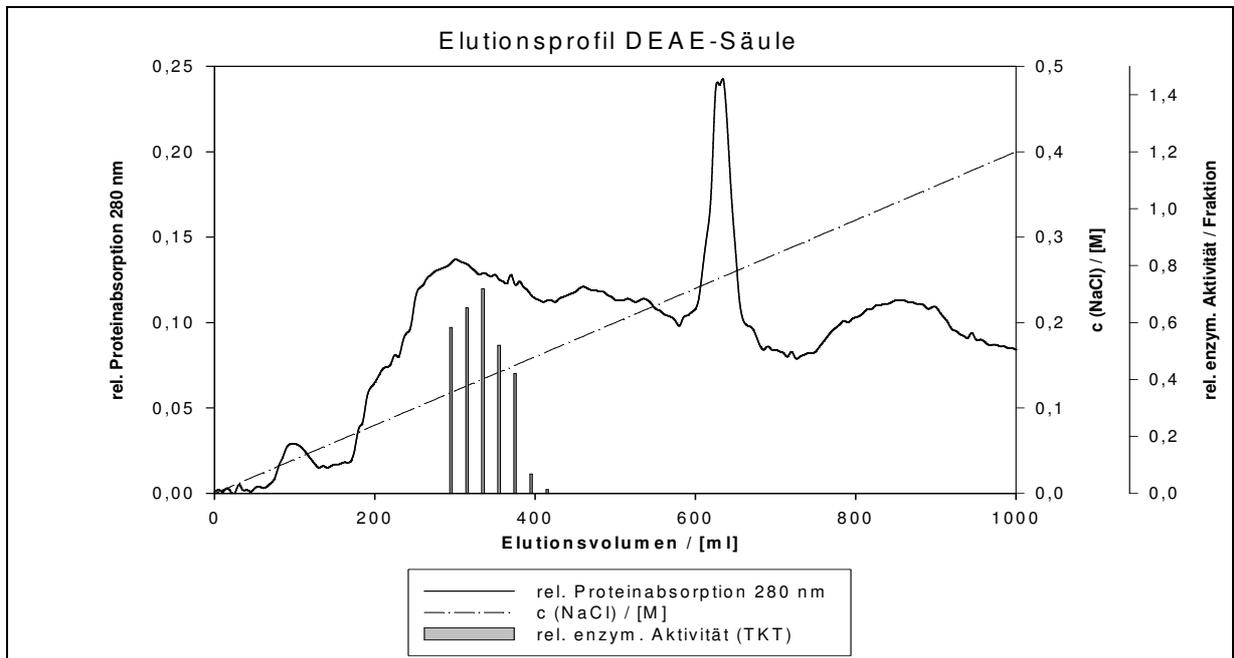


Abb. 3-28: Elutionsprofil von Transketolase von einer DEAE-Cellulose-Säule mit einem NaCl-Gradienten.

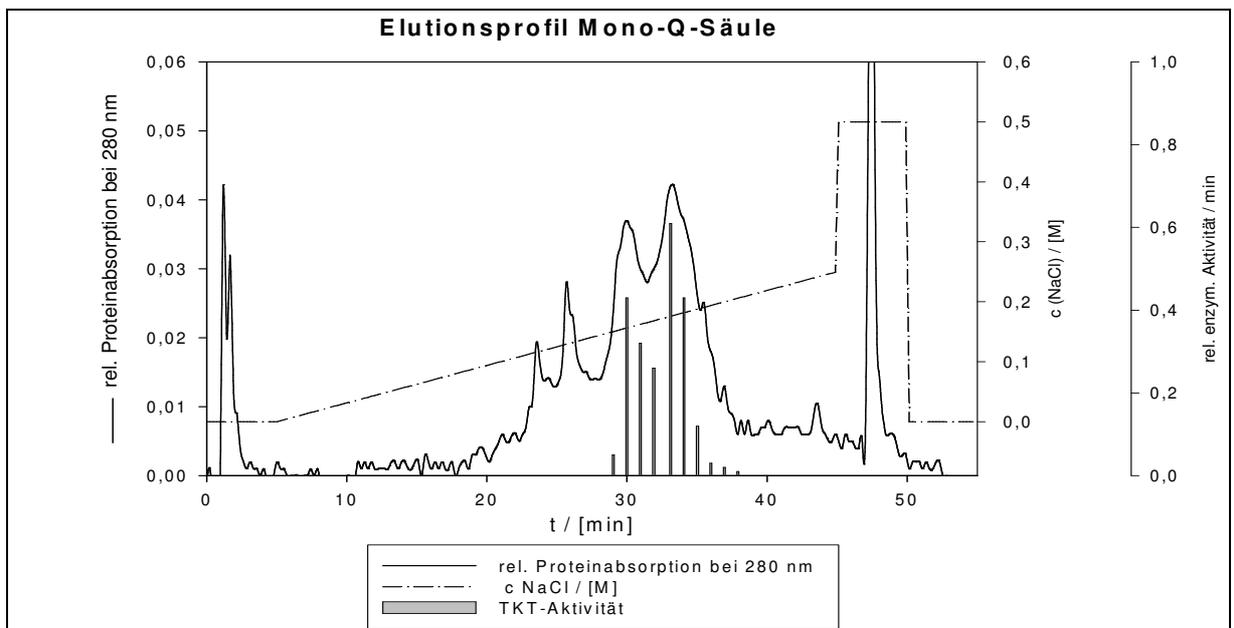


Abb.: 3-29: Elutionsprofil von Transketolase von einer Mono-Q-Säule mit einem NaCl-Gradienten

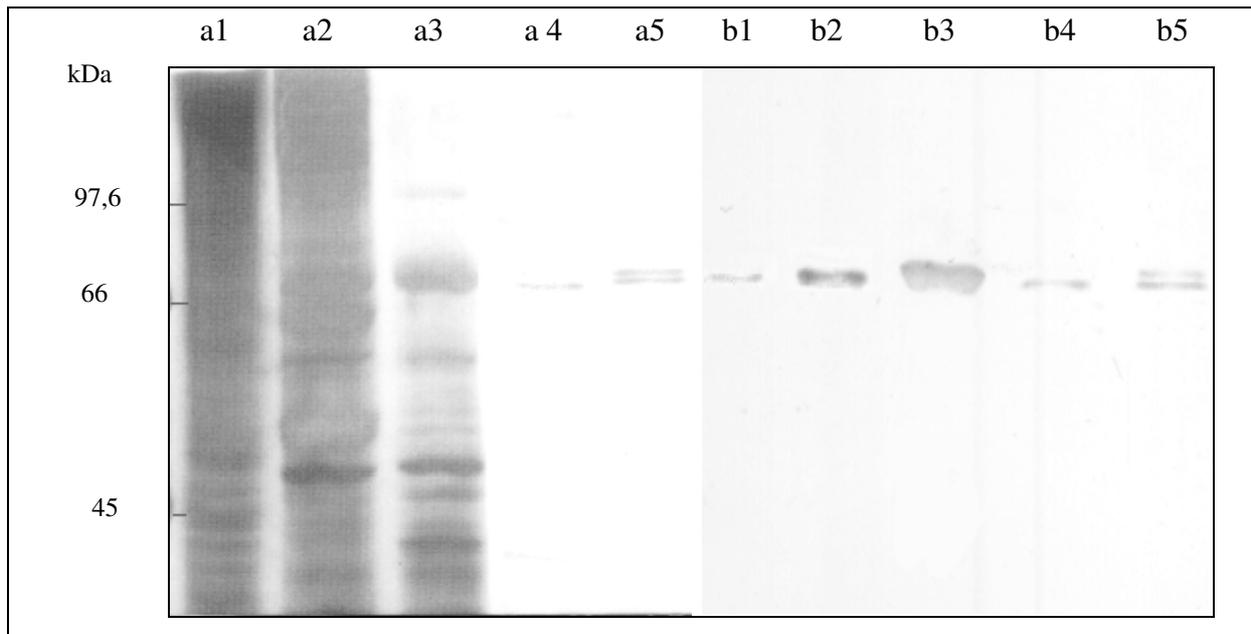


Abb. 3-30: Aufreinigung von Transketolase aus Blättern von 28 h wiederbewässertem *C. plantagineum*-Pflanzen. Proben der einzelnen Aufreinigungsschritte wurden mittels einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Ein Gel wurde silbergefärbt (a1 bis a5), das zweite wurde immunologisch mit Anti-Transketolase-Serum im Westernblot analysiert (b1 bis b5). 1: Rohextrakt, 2: Ammoniumsulfatfällung (55-75% Sättigung bei 0°C), 3: DEAE-Cellulose-Säule, 4: Mono-Q-Fraktion 1, 5: Mono-Q-Fraktion 2

Die Aufreinigung der Transketolase sowohl aus unbehandeltem als auch aus wiederbewässertem Blattgewebe wurde durch SDS-PAGE und immunologischen Nachweis des Enzyms nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran überprüft (Abb.3-30). Durch denaturierende SDS-PAGE und Westernblot-Analyse (2.2.8.3.1) zeigte sich, dass Transketolase aus *C. plantagineum* in zwei Banden mit Molekulargewichten von ca. 73 und 75 kDa durch den eingesetzten Antikörper nachweisbar ist.

Eine Zusammenfassung der einzelnen Aufarbeitungsschritte ist in Tabelle 3-5 zu sehen.

Tab.3-5: Zusammenfassung der einzelnen Aufreinigungsschritte von Transketolase aus 103 g (FW) wiederbewässerten Blättern (28 h) von *C. plantagineum*

Fraktion	totale Aktivität / [U]	spez. Aktivität/[U/µg]	Aufreinigungsfaktor
Rohextrakt	174	0,31	1
AS-Fällung	132	1,49	4,8
DEAE-Säule	97	3,17	10,2
Mono-Q-Säule	24	25,6	82,4

Aufreinigungen aus unbehandelten Blättern von *C. plantagineum* erbrachten eine deutlich höhere Transketolasegesamtaktivität im Rohextrakt der Aufarbeitung (Tab.3-6). Nach Isolierung der Transketolase mittels Ammoniumsulfatfällung, DEAE- und Mono-Q-

Chromatographie konnten auch bei diesen Aufarbeitungen am Ende zwei Banden mit ca. 73 und 75 kDa durch den verwendeten Antikörper identifiziert werden..

Tab.3-6: Zusammenfassung der einzelnen Aufreinigungsschritte von Transketolase aus 74 g (FW) unbehandelten Blättern von *C. plantagineum*

Fraktion	totale Aktivität / [U]	spez. Aktivität/[U/μg]	Aufreinigungsfaktor
Rohextrakt	308	0,25	1
AS-Fällung	227	0,93	3,7
DEAE-Säule	136	3,9	15,6
Mono-Q-Säule	56	16,2	64,8

Mit den oben aufgeführten Reinigungsschritten gelang eine Aufreinigung von Transketolase bis fast zur Homogenität. Bei allen durchgeführten Isolationen konnte eine schwache Bande bei ca. 45 kDa, die vom benutzten Antikörper nicht detektiert wurde, nur durch einen zweiten Mono-Q-Durchlauf völlig eliminiert werden (Abb. 3-31).

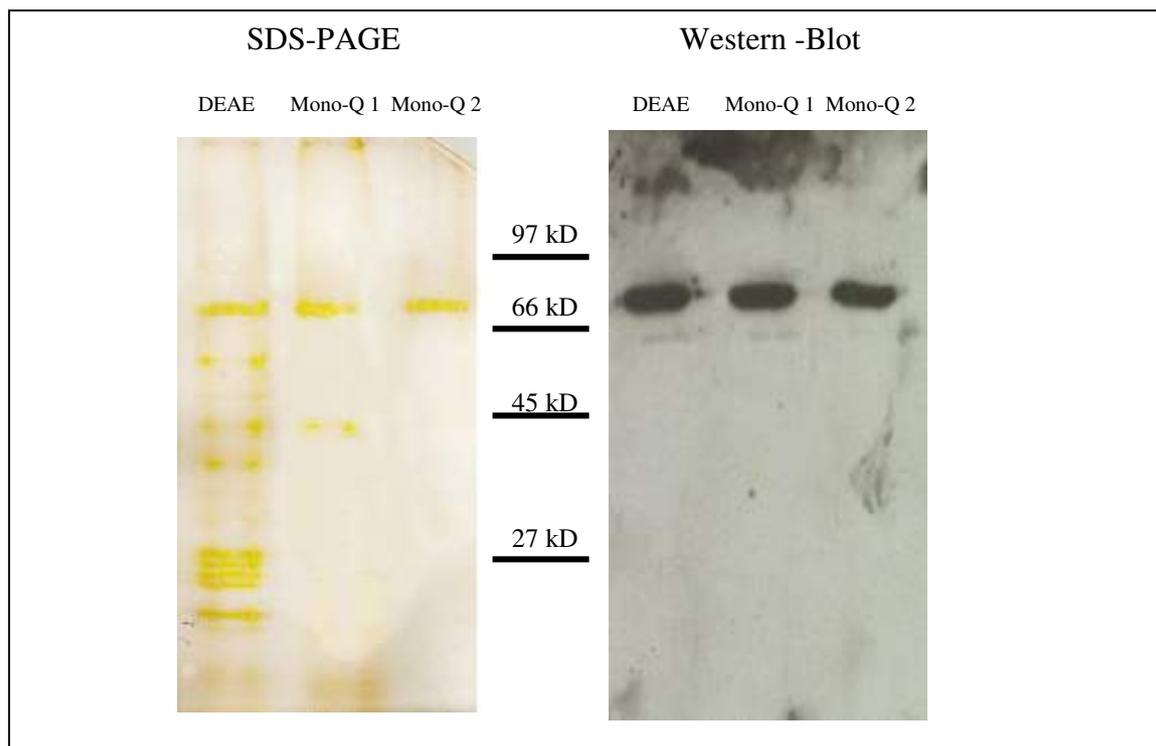


Abb.: 3-31: Nach einem ersten Mono-Q-Durchlauf (Mono-Q 1) wurde in SDS-PAGE der vereinten Transketolasefraktionen noch eine unspezifische Proteinbande bei ca. 45 kD detektiert. Durch einen erneuten Aufreinigungsschritt mit der Mono-Q-Säule (Mono-Q 2) konnte diese Bande eliminiert werden.

Die Transketolaseaktivität von durchgeführten Extraktionen aus 28 h wiederbewässertem Blattgewebe betrug zwischen 40% und 50% der Transketolaseaktivität von unbehandeltem Blattgewebe.

Die einzelnen Aufreinigungsschritte der Transketolase wurden auf Kontamination von Aldolase untersucht. Bei den einzelnen Schritten der Transketolaseaufreinigung konnte bereits nach der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung keine Aldolaseaktivität in Fraktionen mit Transketolase mehr beobachtet werden. Aldolase aus *C. plantagineum* präzipitierte bereits zwischen 25% und 55% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

3.6.3 K_M -Werte für Standardsubstrate von Transketolase

Zur näheren Charakterisierung von Transketolase aus unbehandeltem und wiederbewässertem Blattgewebe von *C. plantagineum* wurden jeweils die K_M -Werte für die Substrate Xu-5-P und R-5-P bestimmt. Die Durchführung erfolgte im wesentlichen wie unter 2.2.11.1 für einen Transketolaseaktivitätstest beschrieben. Für die Bestimmung der K_M -Werte für Xu-5-P wurde die R-5-P-Konzentration konstant bei 1,7 mM gehalten. Die Ru-5-P-Konzentration (die durch eine Epimerase in Xu-5-P umgewandelt wird) wurde zwischen 0 und 1,7 mM variiert. Zur Bestimmung der K_M -Werte von R-5-P wurde die Xu-5-P-Konzentration konstant bei 1,7 mM gehalten und die R-5-P-Konzentration zwischen 0 und 3,4 mM variiert. Die K_M -Werte der zwei verschiedenen Mono-Q-Fractionen unterschieden sich weder bei Transketolase aus unbehandeltem noch bei Transketolase aus wiederbewässertem Blattgewebe. Abb. 3-32 und 3-33 zeigten, dass sich die K_M -Werte für die beiden Substrate auch während der Wiederbewässerung nicht signifikant ändern.

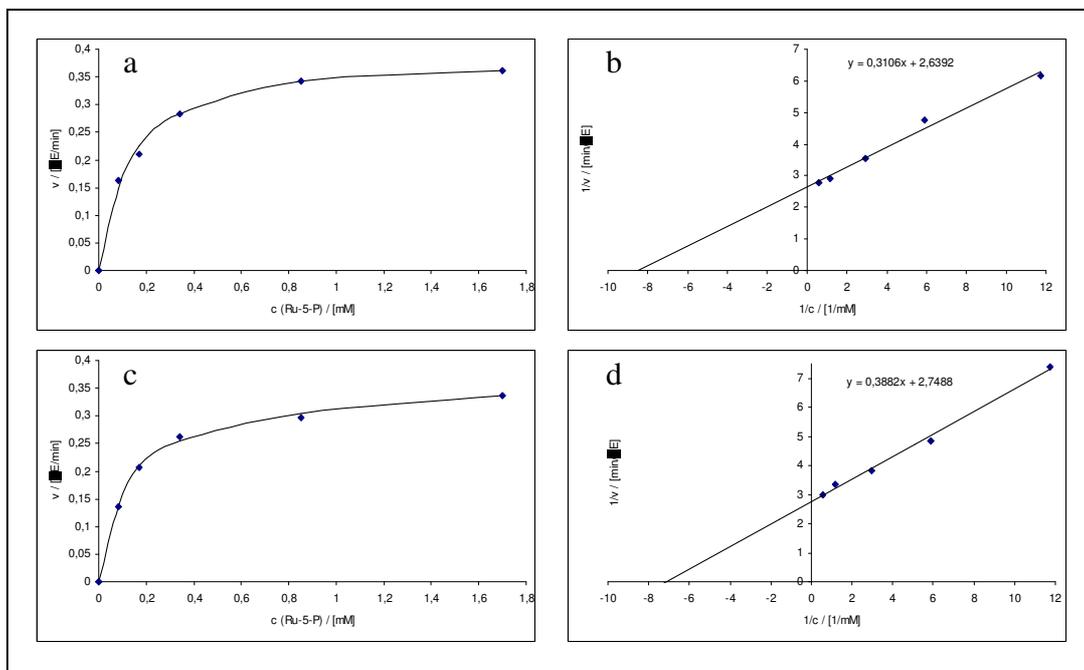


Abb.3-32: Michaelis-Menten-Kinetik und Lineweaver-Burk-Diagramm zur Bestimmung der K_M -Werte für das Donorsubstrat Xu-5-P von Transketolase aus unbehandeltem (a und b) und wiederbewässertem (c und d) Blattgewebe.

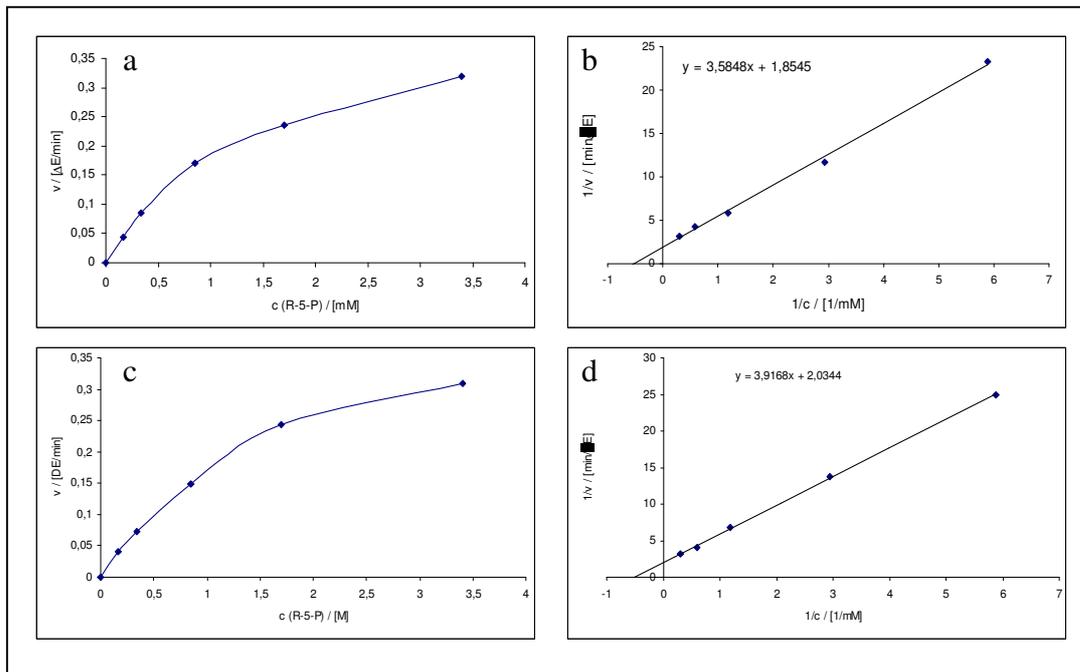


Abb.3-33: Michaelis-Menten-Kinetik und Lineweaver-Burk-Diagramm zur Bestimmung der K_M -Werte für das Akzeptorsubstrat R-5-P von Transketolase aus unbehandeltem (a und b) und wiederbewässertem (c und d) Blattgewebe.

Die K_M -Werte für Xu-5-P betragen 0,12 mM für Transketolase aus unbehandeltem und 0,14 mM für Transketolase aus wiederbewässertem Blattgewebe. Die ermittelten K_M -Werte für R-5-P betragen jeweils 1,9 mM. Die ermittelten K_M -Werte für Xu-5-P wurden für Transketolase aus unbehandeltem und 28 h wiederbewässertem Blattgewebe jeweils für Fraktion I und II, die nach dem letzten Aufreinigungsschritt über eine Mono-Q-Säule eluiert werden konnten, bestimmt (Tab.3-7).

Tab.3-7: K_M -Werte für verschiedene Transketolasefraktionen.

Fraktion	unbehandelt		28 h wiederbewässert	
	$K_M (R-5-P) / [mM]$	$K_M (Xu-5-P) / [mM]$	$K_M (R-5-P) / [mM]$	$K_M (Xu-5-P) / [mM]$
Mono-Q-I	1,9	0,12	1,9	0,13
Mono-Q-II	1,9	0,11	1,8	0,14
Mono-Q-I+II	1,9	0,12	1,9	0,14

3.6.4 pH-Abhängigkeit der Transketolaseaktivität

Zur Bestimmung des pH-Optimums von Transketolase wurde die Aktivität des Enzyms bezogen auf die Substrate R-5-P und Xu-P in einem pH-Intervall von pH 6 bis pH 8,75 bestimmt.

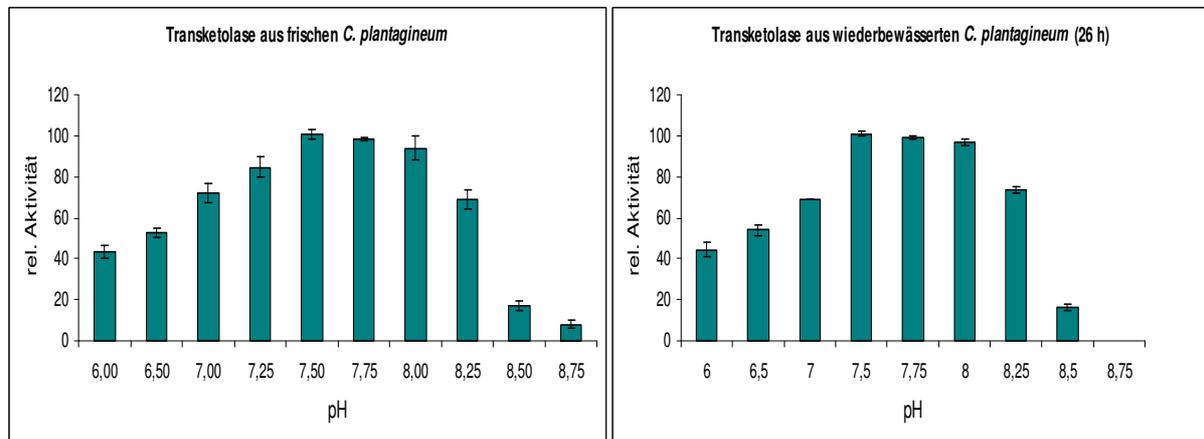


Abb.3-34: relative Aktivität von aufgereinigter Transketolase bezogen auf pH 7,5. Die übrigen Reaktionsbedingungen entsprachen dem normalen Aktivitätstest (2.2.11.1).

Bei Transketolase aus unbehandelten wie auch aus wiederbewässerten Blättern von *C. plantagineum* liegt das pH-Optimum zwischen pH 7,5 und pH 8. Oberhalb von pH 8 kommt es zu einem drastischen Abfall der Aktivität. Die Aktivitätsmessungen wurden bei 25 °C durchgeführt (Abb.3-34).

3.6.5 Temperaturstabilität von Transketolase

Transketolase aus *C. plantagineum* kann bei 4 °C in einer Lösung aus 50 mM Tris-HCl pH 8,1 (4 °C); 10% v/v Glycerin und 10 mM MgCl₂ mindestens vier Wochen mit einem Aktivitätsverlust von 10% gelagert werden.

Bei Raumtemperatur ist in der gleichen Lösung (pH 7,6) nach 24 h kein nennenswerter Aktivitätsverlust zu beobachten. Nach 24 h betrug die Aktivität noch 97% der Ausgangsaktivität. Nach 72 h wurde noch eine Restaktivität von 90% ermittelt (Abb.3-35).

Bei 30 °C in gleicher Lösung (pH 7,6) wurde eine um 30% höhere Ausgangsaktivität bezogen auf die Transketolaseaktivität bei 25 °C beobachtet. Die Stabilität des Enzyms ist bei 30°C geringer. Nach 24 h betrug die Aktivität noch 93%, nach 48 h 80% der Anfangsaktivität.

Die Messung wurde mit 15 U Transketolase (bezogen auf R-5-P und Ru-5-P bei 25 °C) aus wiederbewässertem *C. plantagineum* Blattgewebe nach chromatographischer Aufreinigung durchgeführt.

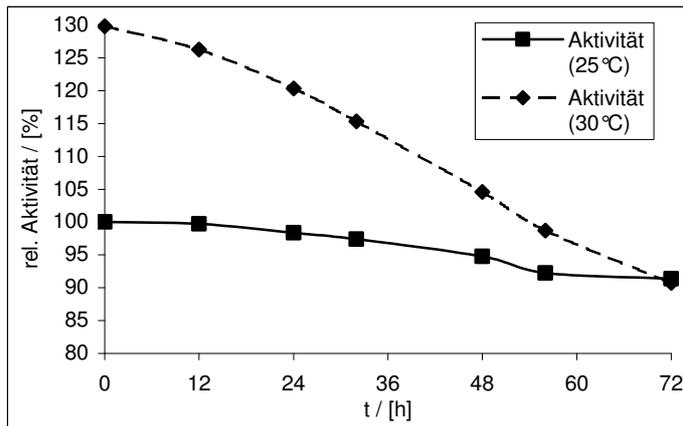


Abb.3-35: Aktivitätsverlust von Transketolase aus wiederbewässertem Blattgewebe von *C. plantagineum* bezogen auf die Anfangsaktivität von Transketolase unter den gewählten Synthesebedingungen von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose-8-P.

3.6.6 Subzelluläre Lokalisation von Transketolase in Blättern

Zur Lokalisation von Transketolaseaktivität innerhalb der Zellen wurden Chloroplasten aus unbehandelten und 30 h wiederbewässerten Blättern von *C. plantagineum* isoliert (2.2.1.5). Die isolierte cytosolische Fraktion wurde direkt einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung unterworfen. Die Fraktionen mit teilweise zerstörten und ganzen Chloroplasten wurden jeweils einer Enzymextraktion und einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung unterzogen. Transketolase exprimierte zwischen 55% und 80% Sättigung (0 °C). Die Transketolaseaktivitäten der cytosolischen Fraktion, der Fraktion mit zerbrochenen und der Fraktion mit ganzen Chloroplasten wurden bestimmt. In unbehandelten und 30 h wiederbewässerten Blättern ist die Transketolaseaktivität zu ungefähr 70% in den Chloroplasten lokalisiert (Tab.3-8). Die Transketolaseaktivität in den durch Dichtegradientenzentrifugation isolierten Chloroplasten von unbehandelten Blättern ist mit 2,2 U/g DW gegenüber der detektierten Aktivität in Chloroplasten aus wiederbewässerten Blättern (1,3 U/g DW) fast um einen Faktor 2 höher.

In den Fraktionen mit zerbrochenen Chloroplasten konnten immer noch Aktivitäten von 19,7% (unbehandelt) bzw. 17,5% (28 h wiederbewässert) bezogen auf die gesamte ermittelte Transketolaseaktivität gemessen werden.

In den cytosolischen Fraktionen gemessene Transketolaseaktivität kann zum Teil auf aus zerbrochenen Chloroplasten freigesetzte Transketolase zurückgeführt werden, da in Western-Blot-Analysen auch in der cytosolischen Fraktion eine deutliche chloroplastenspezifische Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase-Bande detektiert wurde.

Tab.3-8: Transketolaseaktivität (prozentualer Anteil an der Gesamttransketolaseaktivität) in Chloroplasten und Cytosol.

unbehandelte Blätter (24 g FW)		Aktivität / [U] ([%])
cytosolische Fraktion		8 (10,5)
zerbrochene Chloroplasten		15 (19,7)
intakte Chloroplasten		53 (69,7)
wiederbewässerte Blätter (21 g FW)		Aktivität / [U] ([%])
cytosolische Fraktion		6 (15)
zerbrochene Chloroplasten		7 (17,5)
intakte Chloroplasten		27 (67,5)

Die Transketolaseaktivität scheint in *C. plantagineum* in unbehandelten und wiederbewässerten Blättern hauptsächlich in den Chloroplasten lokalisiert zu sein. Es konnte keine signifikante Änderung während der Wiederbewässerung festgestellt werden.

3.6.7 Substratspezifität von Transketolase

Neben dem bekannten Donorsubstrat Xu-5-P und dem Akzeptorsubstrat R-5-P aus dem Calvin-Cyclus wurden verschiedene andere Substrate für die Transketolase aus *C. plantagineum* getestet. Die Versuche wurden mit Transketolase aus unbehandeltem und wiederbewässertem Blattgewebe durchgeführt.

3.6.7.1.1 Donorsubstrate für Transketolase

Als Donorsubstrate bevorzugten Transketolasen aktivierte Ketosen mit *D-threo*-Konfiguration an den Positionen C3 und C4, wie sie auch bei Xu-5-P, dem natürlichen Donorsubstrat für Transketolasereaktionen im Calvin-Zyklus, zu finden ist..

β -Hydroxypyruvat, Dihydroxyaceton-Phosphat (beides C3-Körper) und Fru-6-P (*D-threo*-Konfiguration; C6-Körper) wurden neben Xu-5-P (C5-Körper) als Donorsubstrate getestet. Als Akzeptorsubstrat diente das natürliche Substrat im Calvin-Zyklus, R-5-P. Die Untersuchung wurde wie unter 2.2.11.4 beschrieben durchgeführt.

Untersuchungen der Ansätze mit Hydroxyaceton-Phosphat als Donorsubstrat zeigten zu keiner Zeit die Bildung des Übertragungsproduktes Sedoheptulose-7-P (Sed-7-P), wie es bei Untersuchungen der Transketolaseaktivitätstests (2.2.11.1) beobachtet wurde (Tab. 3-9).

In Ansätzen mit β -Hydroxypyruvat als Donorsubstrat konnte die Bildung eines Übertragungsproduktes nachgewiesen werden. Durch Vergleich der R_f -Werte einer 2D-

Dünnschichtchromatographie (2.2.4) der gebildeten Substanz mit den R_f -Werte des Übertragungsproduktes Sed-7-P des Transketolaseaktivitätstests (2.2.11.1) konnte die gebildete Substanz als Sed-7-P identifiziert werden.

Die Ausbeuten in Ansätzen mit einem Akzeptorsubstrat-Donorsubstrat-Verhältnis von 1:3 lagen deutlich über den Ausbeuten der Ansätze mit einem Verhältnis von 1:1 (Tab.3-9).

In Ansätze mit Fru-6-P als Donorsubstrat konnte ebenfalls die Bildung eines Übertragungsproduktes nachgewiesen werden. Durch Vergleich der R_f -Werte der gebildeten Substanz konnte diese ebenfalls als Sed-7-P identifiziert werden. Die Ausbeuten der Ansätze mit Fru-6-P lagen deutlich unter den Ausbeuten mit β -Hydroxypyruvat, aber waren auch hier bei einem Akzeptorsubstrat-Donorsubstrat-Verhältnis von 1:3 höher als in Ansätzen mit einem Akzeptorsubstrat-Donorsubstrat-Verhältnis von 1:1 (Tab. 3-9).

Tab.3-9: Ausbeute an Sedoheptulose-7-P bezogen auf das Akzeptorsubstrat.

Transketolase	Donorsubstrat	Ausbeute / [%]			
		Verhältnis Akzeptor-Donor 1:3		Verhältnis Akzeptor-Donor 1:1	
		8 h	24 h	8 h	24 h
Fr. Blattgewebe	Hydroxyaceton-Phosphat	0 %	0 %	0 %	0 %
Fr. Blattgewebe	β -Hydroxypyruvat	45 \pm 5 %	52 \pm 3 %	10 \pm 1 %	21 \pm 3 %
Fr. Blattgewebe	Fru-6-P	33 \pm 2 %	37 \pm 3 %	9 \pm 2 %	12 \pm 1 %
reh. Blattgewebe (28h)	Hydroxyaceton-Phosphat	0 %	0 %	0 %	0 %
reh. Blattgewebe (28h)	β -Hydroxypyruvat	43 \pm 7 %	51 \pm 1 %	9 \pm 1 %	23 \pm 3 %
reh. Blattgewebe (28h)	Fru-6-P	36 \pm 1 %	42 \pm 4 %	11 \pm 1 %	13 \pm 1 %

3.6.7.1.2 Ausbeuteoptimierung mit β -Hydroxypyruvat als Donorsubstrat

Die Transketolasereaktion wird irreversibel, wenn β -Hydroxypyruvat als Donorsubstrat genutzt wird. Untersuchungen zur Ausbeuteoptimierung in Bezug auf das Akzeptorsubstrat-Donorsubstrat-Verhältnis mit R-5-P als Akzeptorsubstrat und β -Hydroxypyruvat als Donorsubstrat zeigten, dass durch eine Steigerung des Verhältnisses der beiden Edukte über 1:3 hinaus keine wesentliche Verbesserung der Ausbeute an Sed-7-P mehr beobachtet werden kann (Abb.3-36). Ein Verhältnis von 1:1 oder eine höhere Akzeptorsubstrat- als Donorsubstratkonzentration senkte die Ausbeute an Sedoheptulose-7-P merklich (Abb.3-36).

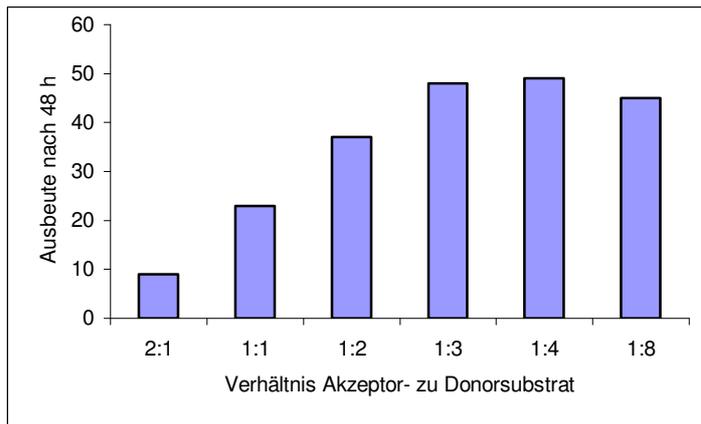


Abb.3-36: Ausbeute an Sed-7-P bezogen auf das Akzeptorsubstrat nach 48 h bei unterschiedlichen Verhältnissen von Akzeptorsubstrat (R-5-P) und Donorsubstrat (β -Hydroxypyruvat).

3.6.7.2 Akzeptorsubstrate für Transketolase

Ribose-5-P ist ein natürliches Substrat für eine Transketolasereaktion im Calvin-Cyclus. R-5-P kann aufgrund des C5-Körpers der aktivierten Aldose und der Art der Transketolasereaktion (bei der lediglich eine C2-Einheit übertragen wird) nicht als Ausgangsstoff für eine 2-D-glycero-D-ido-Oktulosesynthese dienen. Bedingt durch die Konfiguration der C-Atome an den Positionen 3 bis 7 von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose kann von allen vorkommenden Hexosen lediglich Glukose oder eine ihrer aktivierten Formen als Akzeptorsubstrat für eine Transketolase katalysierte Synthese fungieren.

Syntheseansätze mit aufgereinigter Transketolase aus unbehandeltem und wiederbewässertem Blattgewebe von *C. plantagineum* wurden mit R-5-P, Glc, Glc-6-P und UDP-Glc als Akzeptorsubstrate angesetzt (2.2.11.4.2).

3.6.7.2.1 Ribose-5-P

Der Einsatz von R-5-P als Akzeptor- und β -Hydroxypyruvat als Donorsubstrat erbrachte sowohl bei Transketolase aus wiederbewässertem wie auch aus unbehandeltem Blattgewebe Ausbeuten von 50% Sed-7-P bezogen auf das Akzeptorsubstrat. Parallel zu diesen Syntheseansätzen wurde die Umsetzung von R-5-P mit β -Hydroxypyruvat durch eine kommerziell erhältliche Transketolase aus Hefe (SIGMA, Deisenhofen) durchgeführt. Auch hier lag die Ausbeute an Sed-7-P bei 50% bezogen auf das Akzeptorsubstrat.

Von jeweils zwei parallel durchgeführten Ansätzen wurde ein Ansatz zur Vertreibung von im Wasser gelösten CO₂ mit N₂ gespült. Diese Maßnahme brachte jedoch keine gesteigerte Ausbeute (Tab.3-10).

Tab.3-10: Reaktionsausbeuten mit verschiedenen Transketolasen. Die Ausbeute wurde mittels *pulsed amperometric detection* (PAD) bestimmt.

Transketolase	N ₂ -Spülung	Ausbeute
aus Hefe	-	43 %
aus Hefe	+	42 %
aus fr. Blattgewebe	-	39 %
aus fr. Blattgewebe	+	41 %
aus rehydriertem Blattgewebe (28 h)	-	40 %
aus rehydriertem Blattgewebe (28 h)	+	42 %

3.6.7.2.2 UDP-Glukose

Bei Einsatz von UDP-Glc als Akzeptor- und β -Hydroxypyruvat als Donorsubstrat konnte weder bei Syntheseansätzen aus unbehandeltem noch aus wiederbewässertem Blattgewebe eine Übertragungsreaktion beobachtet werden.

3.6.7.2.3 Glukose

Syntheseansätze aus unbehandeltem Blattgewebe zeigten keine Umsetzung von Glc und β -Hydroxypyruvat in 2-D-glycero-D-ido-Oktulose. Unter Verwendung von aufgereinigter Transketolase aus wiederbewässerten Blättern konnte hingegen eine langsame Umsetzung von Glc und β -Hydroxypyruvat in 2-D-glycero-D-ido-Oktulose beobachtet werden. Die Reaktionsgeschwindigkeit der Übertragungsreaktion mit der Aldose als Akzeptorsubstrat liegt jedoch weit unter der der aktivierten Form Glukose-6-P (siehe 3.6.7.2.4). Nach 240 h wurde die Ausbeute mittels GC/FID auf 1,1 % bezogen auf das Akzeptorsubstrat bestimmt.

Die Aktivität von Transketolase betrug nach 240 h Inkubation unter Synthesebedingungen noch 26 % der Anfangsaktivität.

3.6.7.2.4 Glukose-6-P

Bei Einsatz von Glc-6-P konnte mit kommerziell erworbener Transketolase aus Hefe (SIGMA, Deisenhofen) die Bildung eines Übertragungsproduktes beobachtet werden. Die Ausbeute lag nach 24 h bei 44% bezogen auf das Akzeptorsubstrat Glc-6-P (Tab. 3-11). In Reaktionsansätzen mit aufgereinigter Transketolase aus unbehandeltem Blattgewebe konnte

kein Übertragungsprodukt nachgewiesen werden. In Ansätzen mit aufgereinigter Transketolase aus wiederbewässertem Blattgewebe konnte mittels HPLC-Analysen die Bildung eines Übertragungsproduktes gezeigt werden (Abb.3-37)

Tab.3-11: Reaktionsausbeuten mit verschiedenen Transketolasen. Die Ausbeute wurde mittels PAD und enzymatisch (2.2.11.3) bestimmt. Die Ausbeute bezieht sich auf das Akzeptorsubstrat.

Transketolase	Ausbeute
aus Hefe	44%
aus fr. Blattgewebe	keine Übertragungsreaktion
aus rehydriertem Blattgewebe (28 h)	14%

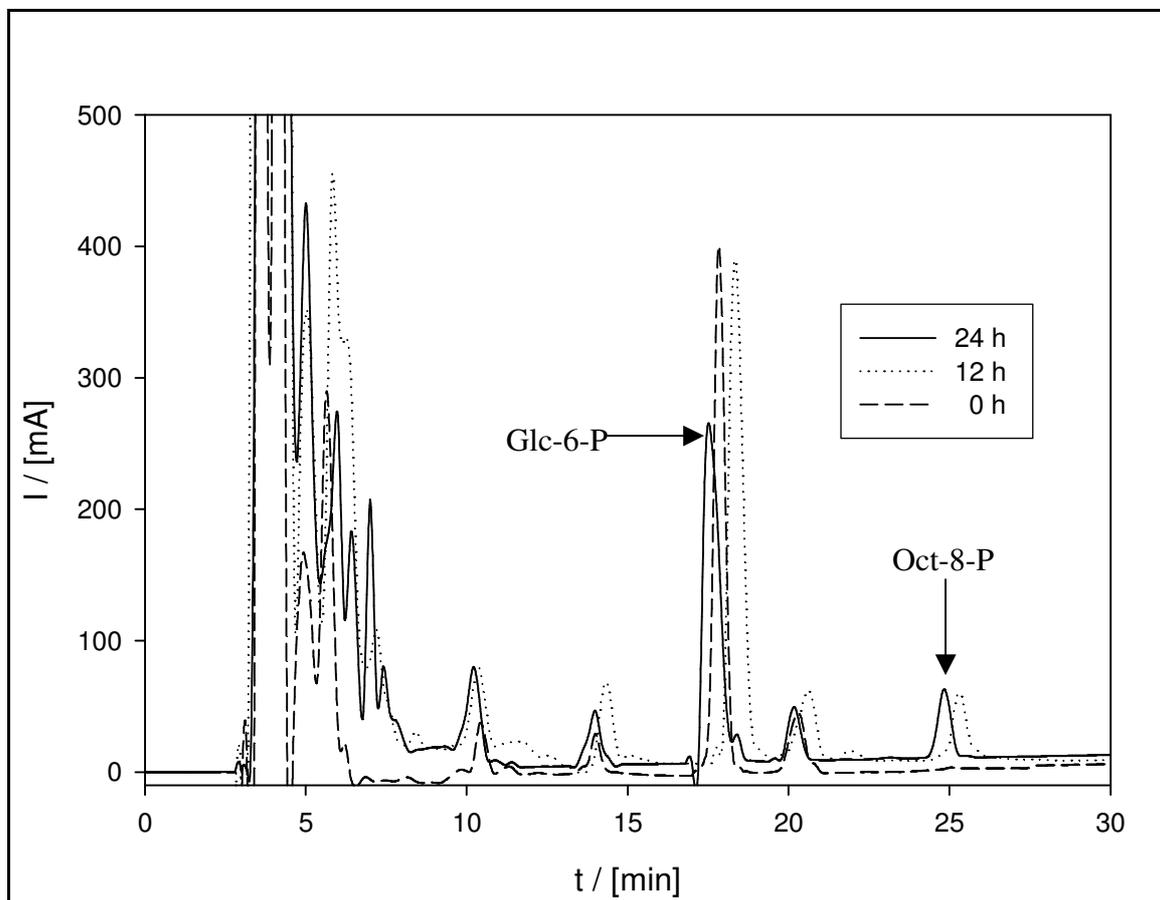


Abb.3-37: Bildung von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose-8-P aus Glc-6-P und β -Hydroxypyruvat.

Nach Dephosphorylierung (2.2.2.2) wurde die entstandene Substanz mittels GC/MS als 2-D-glycero-D-ido-Oktulose identifiziert (Abb.3-38 und 3-39). Aufgrund der eingesetzten Substanzen, der Identifizierung des dephosphorylierten Produktes als 2-D-glycero-D-ido-Oktulose und der gewählten Reaktionsart kann auf die Bildung von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose-8-P als Reaktionsprodukt der Transketolasereaktion geschlossen werden.

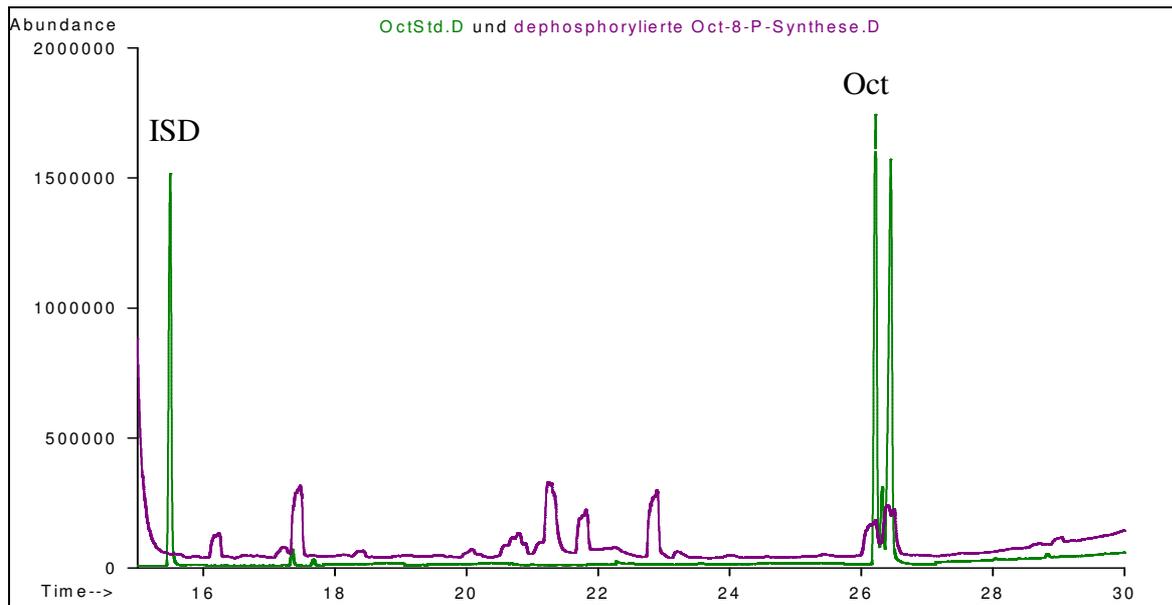


Abb.3-38: Nachweis von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose aus einer Transketolase katalysierten *in vitro*-Synthese von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose-8-P mit anschließender Dephosphorylierung des Syntheseproduktes.

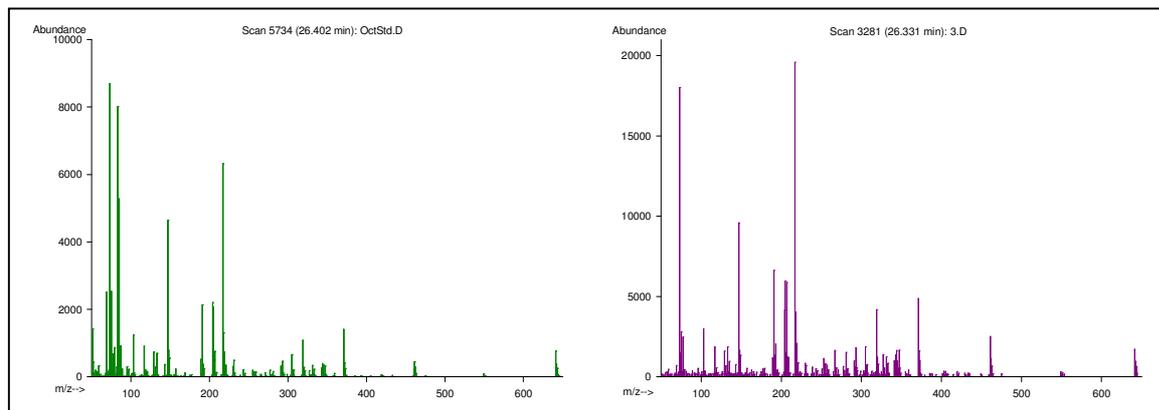


Abb. 3-39: MS-Chromatogramme eines 2-D-glycero-D-ido-Oktulose-Standards und des entstandenen Produktes.

Die Ausbeute der Synthese wurde mittels *pulsed amperometric detection* und enzymatischer Bestimmung von β -Hydroxypyruvat im Syntheseansatz bestimmt. Durch eine enzymatische Bestimmung der Restkonzentration des Donorsubstrates berechnete sich die Ausbeute an 2-D-glycero-D-ido-Oktulose-8-P auf 14 % bezogen auf das eingesetzte Akzeptorsubstrat. Die Bestimmung der Ausbeute mittels HPLC/PAD ergab eine 10%ige Ausbeute (Abb.3-40).

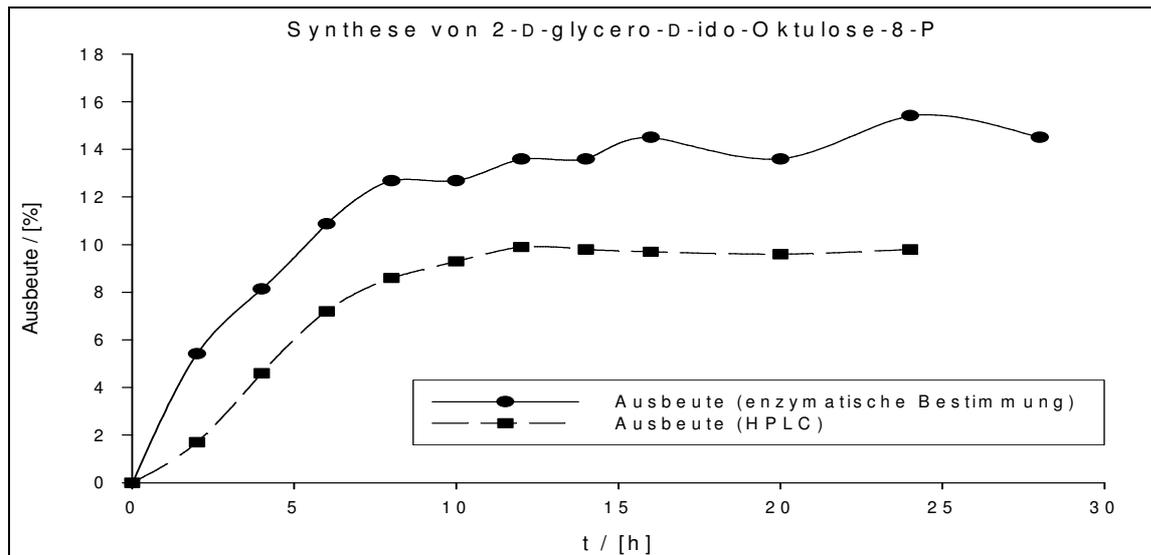


Abb.3-40: Ausbeute an 2-D-glycero-D-ido-Oktulose-8-P durch die enzymatische Umsetzung von Glc-6-P mit β -Hydroxypyruvat.

3.6.8 Inhibierung von Transketolase durch Glukose-6-P

Transketolase aus unbehandeltem Blattgewebe ist nicht in der Lage, 2-D-glycero-D-ido-Oktulose-8-P aus Glc-6-P und β -Hydroxypyruvat zu bilden. Aus diesem Grund wurden die Auswirkungen von Glc-6-P auf die Aktivität von Transketolase aus unbehandelten und 28 h wiederbewässerten Blättern untersucht.

Der einfachste Weg war den Standardtransketolaseaktivitätstest so zu modifizieren, dass statt R-5-P Glc-6-P als Akzeptorsubstrat verwendet wird. Die modifizierten Aktivitätstests wurden mit Transketolase aus unbehandelten wie auch aus wiederbewässerten Blättern für Aufreinigungen nach einer Ammoniumsulfatfällung, einer DEAE- und einer Mono-Q-Chromatographie durchgeführt. Alle Tests zeigten mit Glc-6-P statt R-5-P als Akzeptorsubstrat eine Transketolaseaktivität. Da Transketolase aus unbehandelten Blättern kein Übertragungsprodukt bei Syntheseansätzen mit Glc-6-P als Akzeptorsubstrat zeigte, wurden die Bedingungen des Tests näher untersucht. In allen Fällen zeigten Untersuchungen, dass bereits bei alleiniger Zugabe von Ru-5-P (wird durch eine Epimerase in Xu-5-P, das Donorsubstrat der Reaktion, überführt) oder alleiniger Zugabe von R-5-P in den Aktivitätstest jeweils eine Aktivität gemessen werden kann.

Für die folgenden Untersuchungen mussten die aufgereinigten Transketolasefraktionen aus frischem und wiederbewässertem Blattgewebe ein zweites mal über eine Mono-Q-Säule gegeben werden bis gelelektische Untersuchungen die Eliminierung von zwei schwache Banden bei ca. 46 und 31 kDa zeigten. Ohne die Eliminierung der Proteine, die diese Banden in SDS-PAGE erzeugen, wurde immer noch eine Transketolaseaktivität von 5% bis 10%

bezogen auf den Standardaktivitätstest bei alleiniger Zugabe von R-5-P gemessen. Dies lässt darauf schließen, dass die Transketolasefraktionen zumindest bis zur zweiten Mono-Q-Chromatographie mit einer aktiven Ribose-5-P-3-Epimerase kontaminiert war. Nach einem erneuten Mono-Q-Durchlauf zeigte Transketolase aus unbehandeltem Blattgewebe bei Aktivitätstests mit alleiniger Zugabe des Donorsubstrates Ru-5-P noch eine messbare Restaktivität von 0,29 U/μg. Parallel durchgeführte Aktivitätstests mit Glc-6-P und Ru-5-P zeigten eine etwas geringere Aktivität von 0,24 u/μg (Tab.3-12). Die erneut aufgereinigte Fraktion aus wiederbewässertem Blattgewebe zeigte bei alleiniger Zugabe von Ru-5-P nur noch eine geringe Aktivität von 0,018 U/μg. Untersuchungen mit Glc-6-P als Akzeptor- und Ru-5-P als Donorsubstrat zeigten in Ansätzen mit Transketolase aus wiederbewässerten Pflanzen eine spezifische Aktivität von 0,83 U/μg Protein und eine Gesamtaktivität von 0,7 U/100 g DW des wiederbewässerten Blattgewebes. Ein parallel durchgeführter Aktivitätstest mit R-5-P als Akzeptorsubstrat zeigte eine spezifische Aktivität von 22,6 U/μg und eine Gesamtaktivität von 16,4 U/100 g DW des wiederbewässerten Blattgewebes (Tab.3-11). Die gemessene Aktivität mit Glc-6-P als Akzeptorsubstrat beträgt ca. 4% der Transketolaseaktivität bezogen auf R-5-P als Akzeptorsubstrat.

Tab.3-12: Transketolaseaktivitäten verschiedener Aufreinigungsschritte von Transketolase aus unbehandeltem (148 g) und 28 h wiederbewässertem (78 g) Blattgewebe. Die ersten zwei Zeilen zeigen die gemessene Aktivität ohne Zugabe des Donorsubstrates. Zeile 3 und 4 geben die gemessenen Aktivitäten des Standardenzymassays an, Zeile 5 und 6 die Aktivitäten des Enzyms mit Glc-6-P als Akzeptorsubstrat. Die Werte nach der Mono-Q-Säulenchromatographie beruhen auf Doppelbestimmungen.

	AS-Fällung		DEAE-Chromatographie		Mono-Q-Chromatographie	
	unbehandelte Pfl.	WDB	unbehandelte Pfl.	WDB	unbehandelte Pfl.	WDB
R-5-P ohne Ru-5-P						
Aktivität [u/μg]	0,76	1,00	3,32	3,13	0,29±0,08	0,018±0,007
Aktivität gesamt [U]	264,7	95,6	163,5	82,5	0,37±0,10	0,007±0,003
R-5-P mit Ru-5-P						
Aktivität [u/μg]	0,88	1,32	3,63	3,42	20,35±3,6	22,6±3,4
Aktivität gesamt [U]	314,0	125,8	178,5	90,1	26,71±4,73	9,4±1,41
Glc-6-P mit Ru-5-P						
Aktivität [u/μg]					0,25±0,03	0,68±0,11
Aktivität gesamt [U]					0,32±0,04	0,28±0,5

Inhibitionsversuche mit Glc-6-P und Transketolase aus unbehandeltem und wiederbewässertem Blattgewebe zeigten in beiden Fällen eine Verringerung der Transketolaseaktivität bei Zugabe von Glc-6-P zum Standardtransketolaseaktivitätstest. Die Ergebnisse der Inhibitionsversuche (2.2.11.4.3) für aufgereinigte Transketolase aus frischem Blattgewebe sind in Abb.3-41 gezeigt.

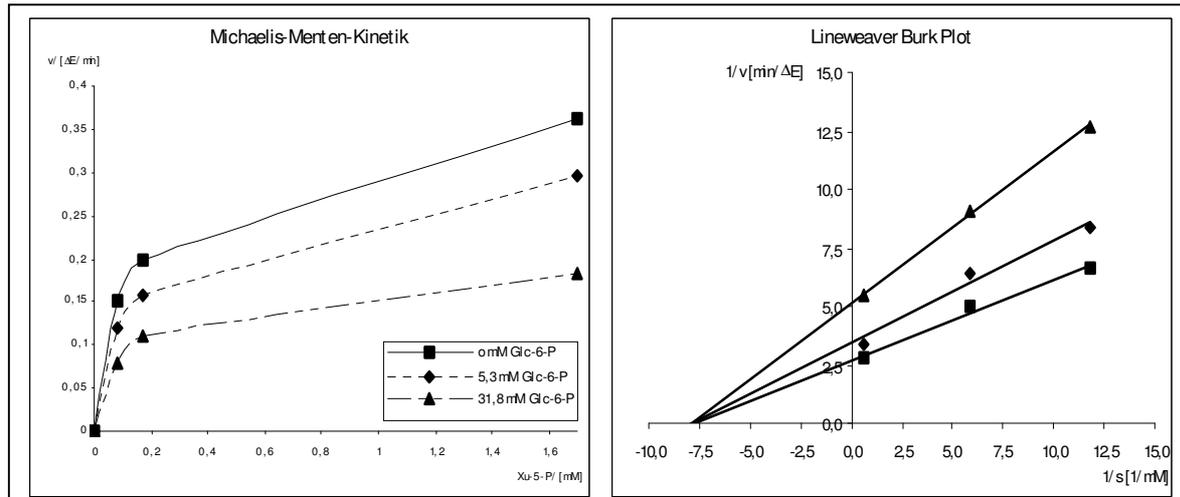


Abb.3-41: Inhibition von isolierter Transketolase aus unbehandelten Blättern von *C. plantagineum* durch Glc-6-P. 5,3 mM Glc-6-P entspricht der Konzentration von Glc-6-P in den gewählten Syntheseansätzen von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose-8-P.

Die Auswertung der von den Michaelis-Menten-Kinetiken abgeleiteten Lineweaver-Burk-Plots zeigte, dass sich bei Zugabe verschiedener Konzentrationen von Glc-6-P der scheinbare K_M -Wert des Donorsubstrates Xu-5-P nicht verändert. Bei allen Experimenten lag er bei $0,13 \pm 0,02$ mM (für Transketolase aus 28 h wiederbewässertem Blattgewebe wurde ein K_M von $0,14 \pm 0,03$ mM bestimmt). Die V_{max} -Werte der Reaktion verringerten sich mit zunehmender Glc-6-P-Konzentration. Diese Ergebnisse deuten auf eine nicht-kompetitive Hemmung von Transketolase aus *C. plantagineum* durch Glc-6-P hin. Transketolase aus wiederbewässertem Blattgewebe zeigte das gleiche Inhibitionsmuster. Gleichzeitig ist aufgereinigte Transketolase aus 28 h wiederbewässertem Blattgewebe, im Gegensatz zu Transketolase aus unbehandeltem Blattgewebe, jedoch in der Lage, mit Glc-6-P als Akzeptorsubstrat *in vitro* die Synthese von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose-8-P zu katalysieren.

3.6.9 Identifizierung der subzellulären Lokalisation der Transketolaseaktivität für das Akzeptorsubstrat Glukose-6-P

Aus 24 g für 28 h wiederbewässertem Blattgewebe wurden Chloroplasten isoliert. Die Fraktionen mit intakten und zerbrochenen Chloroplasten wurden einer Enzymextraktion unterzogen. Nach einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung der cytosolischen Fraktion, der Fraktion mit zerbrochenen Chloroplasten und der Fraktion mit intakten Chloroplasten wurde die Transketolaseaktivität in den einzelnen Fraktionen mit dem Standardaktivitätstest bestimmt (Tab. 3-13).

Tab.3-13: Die Gesamtaktivität aller drei Fraktionen nach der Ammoniumsulfatfällung betrug 36 U. In Klammern ist die prozentuale Verteilung der Aktivität auf die einzelnen Fraktionen angegeben.

Wiederbewässerte Blätter (24 g FW)		Aktivität / [U] ([%])
cytosolische Fraktion		8,1 (22,5)
zerbrochene Chloroplasten		5,3 (14,7)
intakte Chloroplasten		22,6 (62,8)

Die Fraktionen mit Transketolase wurden nicht weiter aufgereinigt, sondern direkt in 2-D-glycero-D-ido-Oktulose-8-P-Syntheseansätzen (2.2.11.4) eingesetzt. Die Reaktionsvolumina wurden so berechnet, dass die eingesetzte Aktivität der Transketolase jeweils 4 U/ml (bezogen auf R-5-P und Xu-5-P als Substrate) betrug. In Syntheseansätzen mit Transketolase aus Fraktionen mit zerbrochenen und intakten Chloroplasten konnte keine Bildung von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose-8-P beobachtet werden. Der Syntheseansatz mit Transketolase aus der 28 h wiederbewässerten cytosolischen Fraktion zeigte hingegen nach 24 h die Bildung eines Übertragungsproduktes (Abb. 3-42).

Eine durchgeführte Dephosphorylierung der Phosphatzucker zeigte in GC/MS-Untersuchungen in den MS-Chromatogrammen, die in der Retentionszeit von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose aufgenommen wurden Massefragmente wie m/z 641, 461, 371 und 217, die auf 2-D-glycero-D-ido-Oktulose hinweisen, es konnte jedoch kein komplettes Fragmentierungsmuster von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose in einem Chromatogramm erhalten werden, da die eingesetzten Mengen zu gering waren.

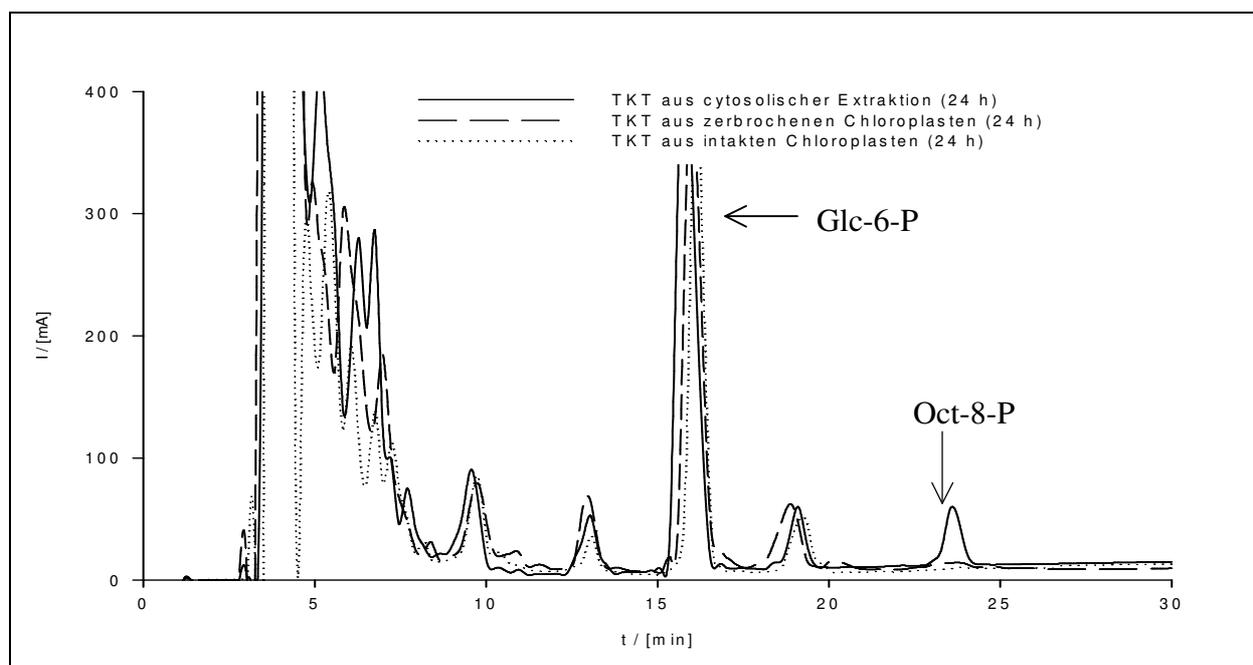


Abb.3-42: 2-D-glycero-D-ido-Oktulose-Syntheseansätze mit Transketolase (TKT) aus 28 h wiederbewässertem Blattgewebe. Die Transketolase wurde aus intakten Chloroplasten, aufgebrochenen Chloroplasten und der cytosolischen Fraktion mittels Ammoniumsulfatfällung vorgereinigt. Als Substrate dienten Glukose-6-P und β -Hydroxyppyruvat.

3.7 Identifizierung von Isoformen der Transketolase

Bisherige Untersuchungen zeigten zu keiner Zeit eine posttranslationalen Modifikationen von Transketolasen in unbehandeltem und wiederbewässertem Blattgewebe von *C. plantagineum* (Schwall, 1995). Aufgereinigte Transketolase aus 28 h wiederbewässertem Blattgewebe zeigt jedoch, im Gegensatz zu aufgereinigter Transketolase aus unbehandeltem Blattgewebe, eine Akzeptanz von Glukose-6-P als Akzeptorsubstrat. Gleichzeitig wird aufgereinigte Transketolase aus unbehandeltem und aus 28 h wiederbewässertem Blattgewebe aber auch von Glukose-6-P inhibiert. Eine Möglichkeit diesen Sachverhalt zu erklären liegt in der Induktion von Transketolaseisoformen, die während der Wiederbewässerungsphase induziert werden. Während der Wiederbewässerung von *C. plantagineum* wurde eine Induktion der für Transketolase kodierenden Transkripte tkt7 und tkt10 beobachtet (Bernacchia et al., 1995). Diese starke Induktion konnte jedoch nicht auf der Proteinebene nachgewiesen werden. In 2D-PAGE wurden Transketolasebanden aus SDS-PAGE von Transketolase aus unbehandelten und wiederbewässerten Blättern von *C. plantagineum* durch isoelektrische Fokussierung in mehrere Spots mit unterschiedlichem pI aufgetrennt (Abb.3-43). Die Spots verteilten sich über einen pH-Bereich von pH 5,9 bis pH 6,3. Die in eindimensionalen SDS-PAGE beobachtete Doppelbande konnte auch im 2D-PAGE gezeigt werden. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen Transketolase aus frischem und 28 h wiederbewässertem Blattgewebe festgestellt werden. Es konnte weder ein verändertes Verhältnis der Spots zueinander noch die Bildung eines neuen Spots gezeigt werden. Nach der Isolierung der detektierten Spots und dem Verdau der Proteine mit Trypsin zeigten MALDI TOF-MS-Untersuchungen (**m**atrix **a**ssisted **l**aser **d**esorption **i**onisation **t**ime of **f**light) in allen detektierten Transketolasespots Hinweise auf TKT3. Besonders in Spot 3 konnten deutliche Hinweise auf TKT3, in Form von sechs Massepeaks mit hoher Intensität, gefunden werden. In Spot 2 konnten, neben Massepeaks, die TKT3 zugeordnet werden können, acht Massepeaks detektiert werden, die durch Datenbankabgleich (SWISSPROT) TKT10 zugeordnet werden konnten. Für eine Sequenzierung, und damit eine sichere Identifizierung, war die Intensität der Peaks bisher aber nicht ausreichend.

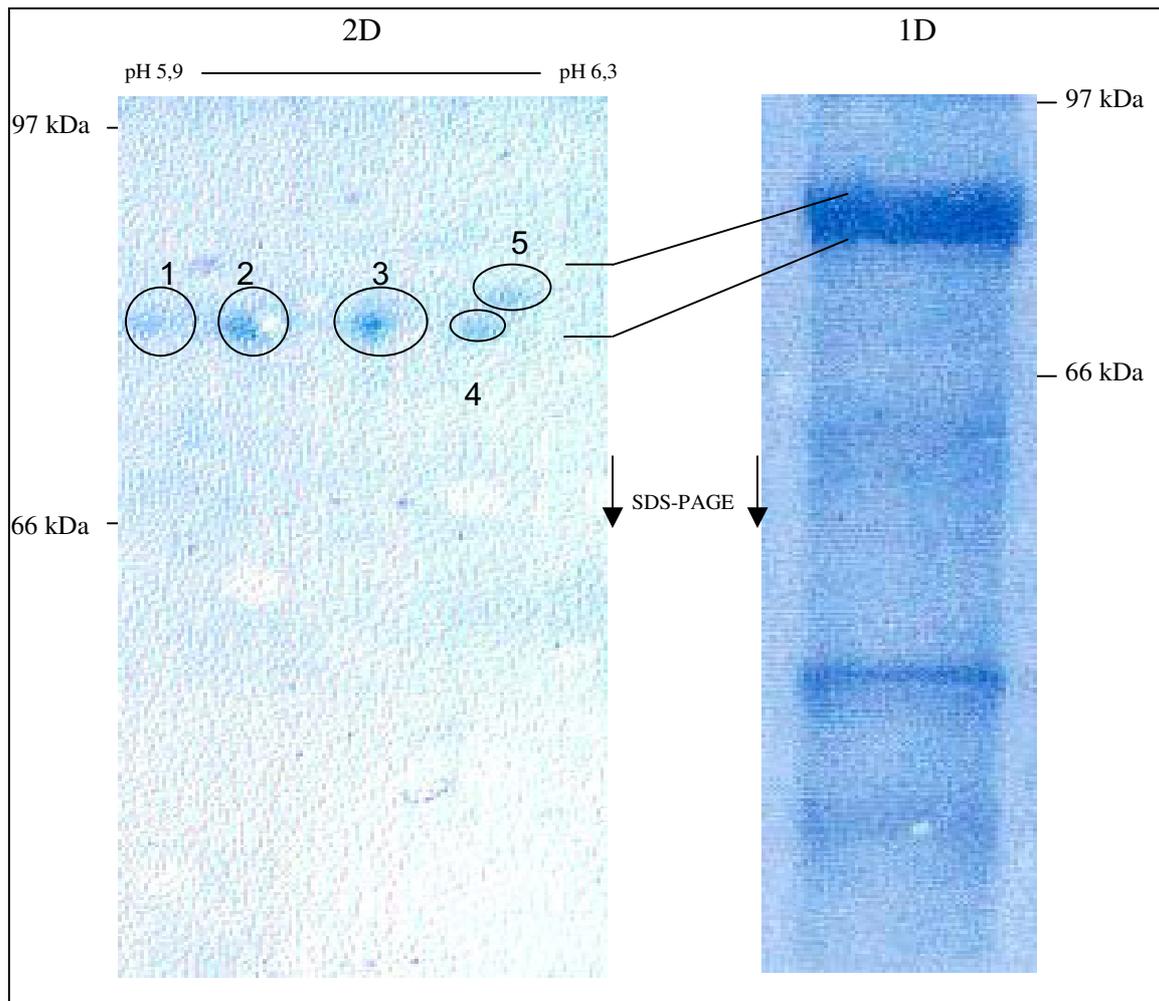


Abb.3-43: 2-D-PAGE von Transketolase aus 28 h wiederbewässertem Blattgewebe von *C. plantagineum*. Die Transketolase wurde nur bis einschließlich der DEAE-Säulenchromatographie aufgereinigt. In Spot 1 bis 5 sind Hinweise auf TKT3 zu finden.

3.8 Vorkommen von β -Hydroxypyruvat in *Craterostigma plantagineum*

Alle bisher untersuchten Transketolasen sind in der Lage, β -Hydroxypyruvat als Donorsubstrat zu verwenden. Transketolase aus *C. plantagineum* überträgt ebenfalls eine aktivierte C2-Einheit von β -Hydroxypyruvat auf ein entsprechendes Akzeptorsubstrat. Aus diesem Grund wurde eine Extraktion aliphatischer, nicht flüchtiger Säuren aus *C. plantagineum* durchgeführt (2.2.13), um diese Substanz in der Pflanze zu identifizieren. In dünnschichtchromatographischen Untersuchungen von Extrakten aus getrockneten und wiederbewässerten Blättern von *C. plantagineum* konnte jedoch keine sichere Identifizierung für eine Substanz mit einem R_f -Wert, der dem R_f -Wert eines benutzten β -Hydroxypyruvat-Standards entspricht, detektiert werden. In frischen Blättern hingegen konnte eine leicht saure Reaktion bei einem R_f -Wert von 0,42 beobachtet werden (Tab.3-14; Abb. 3-44).

Tab.3-14: Standard- R_f -Werte von Pyruvat und β -Hydroxypyruvat. In allen Säureextraktionen konnten Spots mit einem R_f -Wert vergleichbar mit dem R_f -Wert eines Pyruvat-Standards detektiert werden. Lediglich in unbehandelten Blättern konnte eine sichere Identifizierung eines Spots mit einem vergleichbaren R_f -Wert wie für β -Hydroxypyruvat detektiert werden. Die Intensität der Spots wurde mit ---- (sehr schwach) bis +++ (stark) angegeben.

Substanz	R_f			
	Standard	trocken	36 h wiederbewässert	unbehandelt
Pyruvat (Brenztraubensäure)	0,68 (+++)	0,66 (-)	0,68 (+)	0,67 (++)
β -Hydroxypyruvat	0,43 (+++)	0,41 (---)	0,40 (---)	0,42(-)

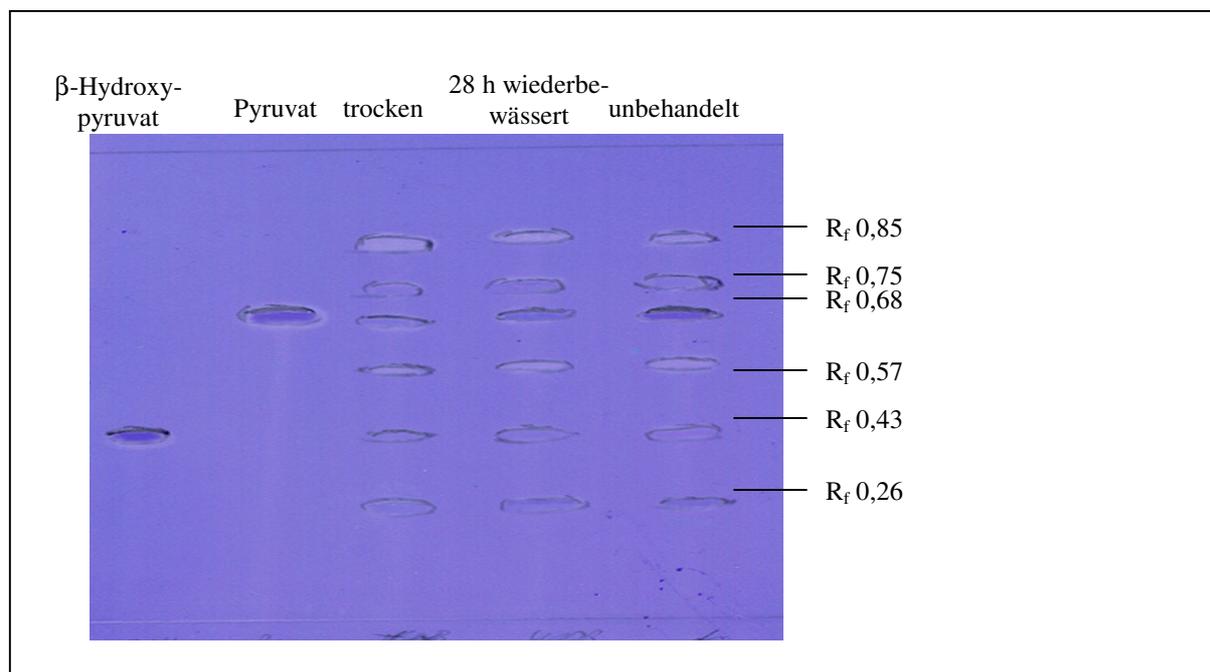


Abb. 3-44: Dünnschichtchromatographische Auftrennung von organischen Säuren aus *C. plantagineum*.

Es wurden weitere, sauer reagierende Substanzen in dem Extrakt aus *C. plantagineum* gefunden. Die Farbintensität dieser Substanzen während der Detektion lagen im Bereich von β -Hydroxypyruvat und lassen damit auf nur geringe Mengen schließen. Die R_f -Werte lagen bei 0,85 ; 0,75 ; 0,57 und 0,26. Die Substanzen wurden nicht näher identifiziert (Abb. 3-44).

4 Diskussion

4.1 Eintrocknungs- und Wiederbewässerungsexperimente mit *Craterostigma plantagineum*, einiger *Lindernia*-Arten und *Crepidorhopalon lactibracteatus*

C. plantagineum besitzt einen ungewöhnlichen Zuckerstoffwechsel, der es der Pflanze bei Trockenstress ermöglicht innerhalb kurzer Zeit große Mengen Saccharose zu synthetisieren. Die Hauptzuckerkomponente in unbehandelten Blättern, die C8-Ketose 2-D-glycero-D-ido-Oktulose, wird während der Eintrocknungsphase nahezu vollständig metabolisiert (Bianchi et al., 1991). Der Zuckerstoffwechsel der Pflanze scheint im engen Zusammenhang mit der Trockentoleranz dieser Art zu stehen. Alle anderen, getesteten *Craterostigma*-Arten gelten ebenfalls als trockentolerant (Fischer, 1992) und weisen auch große Mengen 2-D-glycero-D-ido-Oktulose im unbehandelten und große Mengen Saccharose im ausgetrockneten Zustand auf (Richter, unveröffentlichte Daten). Genau wie die Gattungen *Lindernia* und *Crepidorhopalon*, gehört die Gattung *Craterostigma* der Systematik der afrikanischen Linderniae (Scrophulariaceae) an (Fischer, 1992). Ein aufgrund der Verwandtschaft der Pflanzenarten durchgeführtes Screening nach 2-D-glycero-D-ido-Oktulose in frischem Blattgewebe (3.2.3) ergab für *L. brevidens* hohe Konzentrationen der C8-Ketose (bis zu 220 mg/g DW). Weiterhin wurden geringere Mengen 2-D-glycero-D-ido-Oktulose in *L. philcoxii*, *L. numerilarifolia* und *L. subracemosa* gefunden (Tab.3-3). In zwei weiteren Arten, *L. rotundifolia* und *Crep. lactibracteatus*, konnte die C8-Ketose nicht nachgewiesen werden. Während des Austrocknens aufgenommene Kinetiken verschiedener Zuckerkomponenten zeigten bei *C. plantagineum* und *L. brevidens* die Bildung großer Mengen Saccharose (430 bzw. 180 mg/g DW) bei gleichzeitiger Abnahme der 2-D-glycero-D-ido-Oktulose-konzentration (3.2.4.4 und 3.2.4.5). *C. plantagineum* und *L. brevidens* wurden bis auf einen relativen Wassergehalt von 5,8% bzw. 7,2% ausgetrocknet. Beide Arten konnten erfolgreich nach längeren Trockenperioden wiederbewässert werden. Dabei metabolisieren beide Arten die gebildete Saccharose wieder und synthetisieren 2-D-glycero-D-ido-Oktulose. Von Rahmzadeh (2002) durchgeführte Vitalitätstests während und nach der Wiederbewässerung eingetrockneter Pflanzen zeigten für *C. plantagineum* und *L. brevidens* eindeutig trockentolerante Eigenschaften.

Zur erfolgreichen Wiederbewässerung von *C. plantagineum* war es nötig, die Pflanze die ersten 24 h der Rehydrierung komplett unter Wasser zu belassen, da zu Beginn der Wiederbewässerung eine Wasserabsorption nur über das Wurzelsystem nicht ausreichend ist,

um die Pflanze wiederzubeleben (Gaff, 1977). Bereits nach 24 h konnten die wiederbewässerten Pflanzen mit allen Blättern über die Wasseroberfläche gehoben werden. Nach weiteren 24 h konnten alle Pflanzen erfolgreich in Erde überführt werden.

L. brevidens musste wesentlich länger unter Wasser belassen werden. Obwohl die Pflanze, ähnlich wie *C. plantagineum*, bereits nach 24 h Wiederbewässerung volle Turgeszenz aufwies, vertrockneten verfrüht aus dem Wasser gehobene Stiele und Blätter der Pflanze oft nach nur wenigen Stunden außerhalb des Wassers. Auch die Überführung von *L. brevidens* auf Erde war schwieriger als bei *C. plantagineum*. Überführungsversuche mit Pflanzen, die weniger als sieben Tage komplett unter Wasser wiederbewässert wurden, scheiterten. Der Grund für das erschwerte, aber erfolgreiche Wiederbewässern von *L. brevidens* ist das Wurzelsystem der Pflanzen. Im Gegensatz zum Sprosssystem überlebten eingetrocknete und danach wiederbewässerte Wurzelsysteme der Pflanze die Eintrocknung nicht. Das Wurzelgewebe wurde innerhalb kurzer Zeit nach der Wiederbewässerung braun und starb ab. Innerhalb von ca. einer Woche, war die Bildung neuer Wurzeln am Spross von *L. brevidens* zu beobachten. Teile der Pflanze, die oberhalb neuer Wurzelsysteme lagen, konnten problemlos aus dem Wasser gehoben werden, solange die neu gebildeten Wurzeln unter Wasser blieben. Der Unterschied in der Ausprägung der Trockentoleranz von *L. brevidens* und *C. plantagineum* ist wahrscheinlich im Zusammenhang mit morphologischen und physiologischen Anpassungen an bestimmte Standorte zu verstehen. Es ist allerdings überraschend, dass *L. brevidens* trockenolerante Eigenschaften zeigt, da *L. brevidens* als eine Bewohnerin subtropischer Regenwaldgebiete gilt. Ihr Verbreitungsgebiet ist in flachen Gewässern oder in der Nähe von Flüssen, wo die Pflanze keinerlei Trockenperioden ausgesetzt ist (Fischer, 1992). Dass *L. brevidens* trotzdem Schutzmechanismen gegen Trockenstress besitzt und große Mengen der ungewöhnlichen C8-Ketose 2-D-glycero-D-ido-Oktulose in ihrem frischen Blattgewebe aufweist, deutet auf eine nähere Verwandtschaft zu *C. plantagineum* hin als bisher erwartet wurde.

L. philcoxii wurde als eine Vertreterin für Arten mit geringer 2-D-glycero-D-ido-Oktulose-Konzentration in frischem Blattgewebe eingetrocknet (3.2.4.3). Die Pflanze besitzt eine nur 2 bis 8 cm große, vierkantige, aufrechte Hauptachse, von der 5 bis 7 mm lange und 1,5 bis 2 mm breite Blätter abgehen (Fischer, 1992). Dagegen besaßen *Crep. lactibracteatus* und alle anderen getesteten *Lindernia*-Arten einen 20 bis 60 cm langen Spross von dem jeweils Blätter abgehen. *L. philcoxii* gilt als poikilohydre Pflanze, die meist in Kontakt mit regenzeitlichen Gewässern auftritt (Fischer, 1992). Die aufgenommene Eintrocknungskinetik von *L. philcoxii* weist Parallelen zu den Eintrocknungskinetiken von *C. plantagineum* und *L. brevidens* auf. Zu

Beginn der Eintrocknungsphase kommt es zunächst zu einer vermehrten Bildung von Glukose und Fruktose, gefolgt von einem Abbau dieser Substanzen. Ab ca. 80% relativem Wassergehalt ist eine verstärkte Synthese von Saccharose bei gleichzeitigem Abbau von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose zu beobachten. Im Unterschied zu *C. plantagineum* und *L. brevidens*, die während der Eintrocknungsphase ca. 43 mg bzw. 18 mg 2-D-glycero-D-ido-Oktulose pro 100 mg DW bilden, synthetisiert *L. philcoxii* jedoch nur geringe Saccharosemengen (ca. 2 mg 2-D-glycero-D-ido-Oktulose pro 100 mg DW). GC/FID-Analysen zeigten im Blattgewebe von *L. philcoxii* geringe Spuren von Raffinose. Es konnte, im Gegensatz zu Untersuchungen mit *C. plantagineum* und *L. brevidens*, keine Stachyose im Blattgewebe detektiert werden. Beide Substanzen sind in der Lage, Saccharosekristallisation zu unterdrücken. Durch Raffinose wird die Kristallisation von Saccharose effektiver unterdrückt als durch Stachyose (Smythe, 1967).

Es war in drei unterschiedlichen Rehydrierungsexperimenten nicht möglich *L. philcoxii* stoffwechselaktiv wiederzubewässern. Die 2 cm bis 4 cm großen Pflanzen, die bis zu einem relativen Wassergehalt von 7% eingetrocknet wurden, zeigten bereits während der ersten Stunden der Wiederbewässerung ein braunes, schwammiges Aussehen. Die ersten missglückten Wiederbewässerungsversuche mit *L. philcoxii* wurden mit Pflanzen, die auf feuchtem Filterpapier ausgetrocknet wurden, durchgeführt. Da diese Methode der Eintrocknung bei der geringen Größe der Pflanzen möglicherweise zu schnell war, wurden 16 Pflanzen in Erde belassen und nicht mehr gegossen. Nach 14 Tagen wurde die eine Hälfte der Pflanzen in Erde belassen und komplett unter Wasser wiederbewässert, die andere Hälfte wurde in Erde belassen und Wasser zur Wiederbewässerung hingegen nur bis zum Beginn des Sprosssystems eingefüllt. In allen Fällen verliefen die Wiederbewässerungsexperimente negativ. Die geringe Saccharosekonzentration im getrockneten Blattgewebe der Pflanzen war wahrscheinlich nicht ausreichend um eine protektive Glasphase ausbilden zu können (vergleiche Einleitung). In ausgetrockneten *L. philcoxii* konnte auch keine Trehalose nachgewiesen werden, die neben Saccharose als Schutzsubstanz trockentoleranter Organismen gilt (Kaiser, 1985; Drennan et al., 1993).

L. rotundifolia und *Crep. lactibracteatus*, zwei Arten deren unbehandelte Blattgewebe keine 2-D-glycero-D-ido-Oktulose enthalten, wurden bis zu 19% bzw. 8% relativem Wassergehalt ausgetrocknet (3.2.4.1 und 3.2.4.2). In beiden Arten konnte ein Anstieg der Glukose- und Fruktosekonzentration während der gesamten Eintrocknungsphase beobachtet werden, jedoch kam es bei fortschreitendem Wasserverlust nicht zu einer gesteigerten Saccharosesynthese, wie in den anderen getesteten Arten. Es wurde außerdem keine Bildung von Trehalose

festgestellt. Beide Arten zeigten keine trockentoleranten Eigenschaften, das heißt, die verwendeten Pflanzen konnten nicht stoffwechselaktiv wiederbewässert werden.

Alle bisher untersuchten trockentoleranten Organismen weisen in ihrem getrockneten Gewebe große Mengen der *compatible solutes* Saccharose (Glc[α 1-2 β]Fru) oder Trehalose (Glc[α 1-1 α]Glc) auf (Madin et al., 1975; Crowe et al., 1984; Kaiser, 1985; Hoekstra et al., 1989; Bianchi et al., 1991; Drennan et al., 1993; Garg et al., 2002). Während Trehalose hauptsächlich von niederen Pflanzen, Hefen, Bakterien und tierischen Geweben als eine Antwort auf Trockenstress angereichert wird (Madin et al., 1975; Crowe et al., 1984; Hoekstra et al., 1989; Drennan et al., 1993), wird Saccharose eher in höheren trockentoleranten Pflanzen, von einigen Ausnahmen wie *M. flabellifolius* abgesehen (Drennan et al., 1993), zum Schutz vor Austrocknungsschäden synthetisiert (Kaiser, 1985; Bianchi et al., 1991; Drennan et al., 1993; Garg et al., 2002). Obwohl die Anwesenheit einer dieser beiden Verbindungen keine hinreichende Bedingung für Trockenresistenz ist, scheint sie doch eine notwendige Bedingung zu sein (Crowe et al. 1984; Kaiser, 1985; Bianchi et al., 1991; Drennan et al., 1993). Trockentolerante Pflanzen, die Saccharose als Schutzsubstanz synthetisieren, benötigen zusätzlich Spuren von Substanzen wie Raffinose oder Stachyose im gleichen Gewebe, die die Kristallisation von Saccharose unterdrücken (Smythe, 1967). So kann es zur Ausbildung einer Glasphase kommen, die zum Schutz der Zellen während der Austrocknung nötig ist (Crowe et al., 1992; Green et al., 1989; Hoekstra et al., 1989). In keiner der im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Arten konnte die Bildung von Trehalose als Antwort auf Trockenstress nachgewiesen werden. *In vitro*-Analysen ergaben, dass zur erfolgreichen Stabilisierung von Membranen ein Saccharose-Phospholipid-Verhältnis von mindestens 4:1 vorliegen muss. Die Stabilisierung erfolgt wahrscheinlich durch direkte Interaktion der Zucker mit den Kopfgruppen der Membran-Phospholipide und durch die Fähigkeit von Saccharose in Anwesenheit von Oligosacchariden Glasphasen ausbilden zu können (Hoekstra et al., 1989; Oliver et al., 1998). Im Blattgewebe der trockentoleranten Arten *C. plantagineum* und *L. brevidens* konnten zu jeder Zeit Spuren der Oligosaccharide Raffinose und Stachyose nachgewiesen werden, die in der Lage sind, die Kristallisation von Saccharose zu unterdrücken (Smythe, 1967). Die geringen Mengen Saccharose, die in *L. philcoxii*, *L. rotundifolia* und *Crep. lactibracteatus* detektiert wurden, bestätigen die misslungenen Wiederbewässerungsexperimente dieser Arten. In *L. philcoxii* wurden zumindest Spuren von Raffinose detektiert. In *L. rotundifolia* und *Crep. lactibracteatus* fehlen diese Oligosaccharide im Blattgewebe.

Die überraschende Trockentoleranz von *L. brevidens* lässt sich durch die Anwesenheit von Saccharose, Raffinose und Stachyose in getrocknetem Gewebe der Pflanze erklären. Ein aufgrund der durchgeführten Wiederbewässerungsexperimente erstellter strict-consensus-Baum zeigt, dass es sich bei der Gattung *Lindernia* um keine monophyletische Gruppe handelt (Rahmanzadeh, 2002). Vertreter dieser Gattung, die bisher nach rein morphologischen Gesichtspunkten eingeteilt wurden (Fischer, 1992), finden sich verteilt auf zwei Gruppen. Die erste enthält vier getestete *Craterostigma*-Arten, die eine monophyletische Gruppe innerhalb der ersten Gruppe bilden, *L. brevidens*, *L. subracemosa* und *Torenia vagans*. Die Art *L. brevidens* ist von den untersuchten Taxa am nächsten mit *Craterostigma* verwandt. Alle trockentoleranten Arten befinden sich in der ersten Gruppe. Ob *L. subracemosa* und *T. vagans* trockentolerant sind, ist nicht bekannt. Alle bisher untersuchten, trockentoleranten Pflanzenarten der Systematik der afrikanischen Linderniae (Scrophulariaceae) wiesen großen Mengen 2-D-glycero-D-ido-Oktulose in unbehandeltem und großen Mengen Saccharose in getrocknetem Blattgewebe auf. Aufgrund der geringen, detektierten Menge 2-D-glycero-D-ido-Oktulose in unbehandeltem und der geringen, gebildeten Menge Saccharose im getrockneten Blattgewebe von *L. subracemosa* (3.2.3) ist anzunehmen, dass *L. subracemosa* zu den nicht trockentoleranten Pflanzen zu zählen ist.

In der zweiten Gruppe findet man alle untersuchten Arten, die keine Trockentoleranz und keine oder nur geringe Mengen 2-D-glycero-D-ido-Oktulose in unbehandeltem Blattgewebe aufwiesen (mit Ausnahme von *L. subracemosa*, die in die erste Gruppe eingeordnet wurde). Innerhalb dieser Gruppe bilden die *Lindernia*-Arten eine monophyletische Gruppe (Rahmanzadeh, 2002).

4.2 Untersuchungen zum Zuckerstoffwechsel von *Craterostigma plantagineum*

Der ungewöhnliche Zuckerstoffwechsel der Wiederauferstehungspflanze *C. plantagineum* scheint im direkten Zusammenhang mit dem Erwerb der Trockentoleranz dieser Art zu stehen. Aus diesem Grund sollen hier die Trockenstress induzierten Veränderungen der Zuckerzusammensetzungen im Wurzel- und Sprosssystem der Pflanze näher erläutert werden. Im Wurzelsystem von *C. plantagineum* sind Zucker der Raffinoseserie (Saccharose (Glc[α 1-2 β]Fru), Raffinose (Gal[α 1-6]Glc[α 1-2 β]Fru) und Stachyose (Gal[α 1-6]Gal[α 1-4]Glc[α 1-2 β]Fru)) die Hauptzuckerkomponenten (3.2.2; Norwood et al., 2003). Im Wurzelgewebe junger Sterilkulturpflanzen lagen die Raffinose- und Stachyosekonzentrationen deutlich unter den Konzentrationen, die in älteren, auf Erde und Hydrokultur kultivierten Pflanzen detektiert

wurden (Tab.3-2). Neben diesen Zuckerkomponenten wurde auch 2-D-glycero-D-ido-Oktulose, Glukose und Fruktose in geringeren Konzentrationen im unbehandelten Wurzelgewebe nachgewiesen. Trocknet *C. plantagineum* aus, ist im Wurzelgewebe älterer Pflanzen eine Reduzierung sämtlicher Zuckerkonzentrationen um 40% bis 55% zu beobachten. Die Zuckerkonzentrationen im Wurzelgewebe junger Sterilkulturpflanzen zeigten hingegen keine signifikanten Veränderungen (Tab 3.2). Die Konzentrationen einzelner Saccharide im Wurzelsystem von *C. plantagineum* scheinen vom Alter der Pflanzen oder dem benutzten Medium abhängig zu sein. Die in dieser Arbeit ermittelten Zuckerkonzentrationen im Wurzelsystem von älteren Pflanzen aus Erde und Hydrokultur und die Veränderung der Konzentrationen während der Eintrocknung der Pflanze korrelieren gut mit von Norwood et al. (2003) festgestellten Werten und Veränderungen. Norwood et al. (2003) untersuchten *C. plantagineum*-Pflanzen, die mindestens 2 Monate lang in Erde gediehen. Es wurden Konzentrationen von 408 ± 17 mg/g DW für die Hauptzuckerkomponente Stachyose in unbehandelten Wurzelsystemen älterer Pflanzen ermittelt. Die in dieser Arbeit ermittelten Werte lagen zwischen $361,2 \pm 7,7$ und $339,4 \pm 11,3$ mg/g DW.

Eine Erklärung für die Diskrepanz im Zuckerhaushalt des Wurzelsystems der kleinen, jungen Pflanzen im Verhältnis zu älteren Exemplaren könnte in der Ausprägung des Wurzelsystems und dem benutzten Wachstumsmedium liegen. Die Wurzelsysteme der untersuchten jungen Sterilkulturpflanzen wiesen ausschließlich 4 bis 6 dicke Primärwurzeln auf. Ältere Pflanzen weisen hingegen auch viele sekundäre und tertiäre laterale Wurzeln auf. Es ist nicht auszuschließen, dass sich durch das Ausbilden eines weit verzweigteren Wurzelsystems auch die Fähigkeit des Systems ändert, einzelne Zuckerkomponenten verschieden gut zu speichern oder zu produzieren.

Obwohl eine Verringerung der Raffinose- und Stachyosekonzentration im Wurzelgewebe von *C. plantagineum* während der Austrocknung beobachtet wurde, konnte keine größere Galaktosekonzentration, das Spaltprodukt der durch α -Galaktosidasen katalysierten Hydrolyse von Raffinoseseriezuckern, festgestellt werden. Anscheinend wird die gebildete Galaktose sofort metabolisiert, zum Beispiel über UDP-Glukose.

Im Gegensatz zum Wurzelgewebe ist im Blattgewebe von *C. plantagineum* die C8-Ketose 2-D-glycero-D-ido-Oktulose mit fast 43% des Trockengewichtes des Blattgewebes die Hauptzuckerkomponente (3.2.1; Bianchi et al, 1991). Untersuchungen zeigten, dass die Konzentration der C8-Ketose, unabhängig vom Alter der Blätter oder dem benutzten Medium, in dem die Pflanzen wachsen, gleich ist (3.2.1). Im Vergleich zum Wurzelsystem zeigen sich

im unbehandelten Blattgewebe nur sehr geringe Konzentrationen von Zuckern der Raffinoserie (Tab.3-2).

Während der Austrocknung der Wiederauferstehungspflanze *C. plantagineum* erfährt der Kohlenhydratstoffwechsel in den Blättern signifikante Veränderungen. Die 2-D-glycero-D-ido-Oktulose-Konzentration sinkt drastisch während der Austrocknung der Pflanze ab. Die C8-Ketose wird nahezu vollständig metabolisiert (3.2.4.5). Bei gemäßigtstem Trockenstress (90%-82% relativer Wassergehalt) ist zunächst eine erhöhte Bildung der Monosaccharide Glukose und Fruktose zu beobachten (Abb. 3-15). Beide Substanzen sind osmotisch aktiv. Die Erhöhung der Konzentration dieser Verbindungen kann als Versuch der Pflanze gedeutet werden, durch eine erhöhte Bildung osmotisch aktiver Substanzen dem gemäßigten Wasserverlust durch eine Verringerung des osmotischen Potentials entgegenzuwirken (Galinski, 1993). Bei weitergehendem Wasserverlust sinken die Konzentrationen der beiden Monosaccharide wieder ab, und es ist eine verstärkte Synthese von Saccharose bei gleichzeitiger verstärkter Metabolisierung von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose zu beobachten (82%-35% relativer Wassergehalt).

Die Kohlenstoffquelle für die Saccharoseakkumulation stammt aufgrund der durch Trockenstress gehemmten Photosynthese (Schwab et al., 1989) nicht aus einer photosynthetischen Neusynthese. Untersuchungen der Zuckerkonzentrationen im Wurzelsystem zeigten außerdem, dass die detektierte Menge Saccharose im Blattgewebe nicht durch einen Transport von Saccharose aus dem Wurzelsystem der Pflanze kommen kann: Die Beispielrechnung beruht auf den Werten für ältere Pflanzen aus Hydrokultur (Tab.3-2). Die äquivalente Menge Saccharose, die aus der beobachteten Metabolisierung von Raffinose und Stachyose in den Wurzeln gewonnen werden kann, beträgt ca. 100 mg/g DW. Die Differenz der Saccharosemenge zwischen dem ausgetrockneten und unbehandelten Wurzelsystem beträgt ca. 26 mg/g DW (Tab.3-2) Das Verhältnis des Trockengewichtes des Wurzelsystems zum Trockengewicht des Blattgewebes betrug in allen untersuchten Pflanzen 1:1 bis 1:3. Für den Fall, dass die Gewichtsverteilung von Wurzelgewebe und Blattgewebe gleich wäre, würden so maximal $\frac{1}{4}$ der in getrocknetem Blattgewebe detektierten Saccharosemenge aus dem Saccharosetransport vom Wurzelsystem in das Blattgewebe stammen. Für den häufiger auftretenden Fall, dass die Masse des Blattgewebes größer als die Masse des Wurzelgewebes ist, sinkt der mögliche Anteil der Saccharose, die aus dem Wurzelsystem in das Blattgewebe transportiert wird, weiter ab.

In allen bisher untersuchten, höheren poikilohydran Pflanzen wird Stärke als Kohlenstoffquelle für Saccharose angegeben (Drennan et al., 1993). Obwohl auch in *C.*

plantagineum Stärke nachgewiesen werden kann (Norwood et al., 2000), zeigten Vergleiche der Metabolisierungsrate von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose mit der gut übereinstimmenden Syntheserate von Saccharose (Abb. 3-14 und 3-15) und radioaktive Markierungsexperimente (3.4), dass im Blattgewebe von *C. plantagineum* die C8-Ketose die Kohlenstoffquelle zur Synthese von Saccharose im Fall von Trockenstress ist. Im Blattgewebe von *C. plantagineum* konnten zudem sowohl im unbehandelten wie auch im ausgetrockneten Zustand Spuren von Raffinose und Stachyose (3.2.2) nachgewiesen werden, die für die Schutzfunktion der Saccharose in der Pflanze von entscheidender Bedeutung sind.

C. plantagineum kann lange Trockenperioden in einem Zustand metabolischer Ruhe überstehen. Wird die Pflanze wiederbewässert, erreicht sie innerhalb von 12 h fast völlige Turgeszenz. Nach 24 h Wiederbewässerung ist eine rapide Transformation von Saccharose in ihr Speicherform 2-D-glycero-D-ido-Oktulose zu beobachten, die nach 80 h zu über 85% beendet ist. Radioaktive Markierungsexperimente mit ^{14}C -u-Saccharose zeigten, dass ein Großteil der neu gebildeten 2-D-glycero-D-ido-Oktulose direkt aus Saccharose gebildet wird (3.3.1.1). Ein Teil der Saccharose wird während der Wiederbewässerung zunächst in Glukose und Fruktose umgewandelt. Dieser Vorgang kann als eine Möglichkeit der Pflanze angesehen werden durch eine Veränderung des osmotischen Potentials die Wasseraufnahme zu beschleunigen (Galinski, 1993). Im weiteren Verlauf der Wiederbewässerung werden die Monosaccharide in den Syntheseweg von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose eingeschleust (3.3.1.1). Durchgeführte Wiederbewässerungsexperimente mit ^{14}C -u-Glukose bestätigten diese Beobachtung. Innerhalb von 80 h wurden über 85% der aufgenommenen Radioaktivität aus ^{14}C -u-Glukose von der Pflanze in 2-D-glycero-D-ido-Oktulose eingebaut (3.3.1.1).

4.3 2-D-glycero-D-ido-Oktulose

Wie bereits erwähnt, ist 2-D-glycero-D-ido-Oktulose die Hauptzuckerkomponente in unbehandeltem Blattgewebe der Wiederauferstehungspflanze *C. plantagineum* (Bianchi et al., 1991). Sie dient als Speicherform für Saccharose. Über weitere, physiologische Funktionen dieses Zuckers ist bisher nichts bekannt. Die C8-Ketose zeigt einige bemerkenswerte Eigenheiten. Im Gegensatz zu anderen Monosacchariden, sowohl Aldosen als auch Ketosen, eluiert 2-D-glycero-D-ido-Oktulose von einer Aktivkohlesäule über einen sehr langen Zeitraum. Diese Eigenschaft wurde unter anderem zur Abtrennung von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose von anderen Sacchariden genutzt (3.1).

Versuche einer Quantifizierung von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose mittels *reversed-phase*-Chromatographie waren aufgrund der Unsymmetrie des 2-D-glycero-D-ido-Oktulose-Peaks nicht möglich (Abb.3-5). Alle anderen getesteten Saccharide zeigten hingegen ein normales Elutionsverhalten von einer CarboPac-PA100-Säule. Ein Grund für dieses ungewöhnliche Verhalten kann in den möglichen Erscheinungsformen der Ketose zu finden sein. Zucker sind dazu in der Lage, durch eine intramolekulare Halbacetalbildung eine cyclische Form anzunehmen. Sechsringhalbacetale, die durch intramolekulare Cyclisierung der C5-Hydroxylgruppe einer Aldose entstehen, werden als Pyranosen bezeichnet, Zucker in der Fünfringhalbacetalform werden als Furanosen bezeichnet. Durch die Cyclisierung entsteht ein neues Chiralitätszentrum und entsprechend 2 Diastereomere, die als α - und β -Anomer bezeichnet werden. Kristallin liegen Zucker ausschließlich als Halbacetale vor, in wässrigen Lösungen stehen die cyclischen Formen der Monosaccharide über die offene Form miteinander im Gleichgewicht. Monosaccharide mit fünf oder sechs C-Atomen, wie Ribose (C5), Glukose (C6) oder Fruktose (C6), bilden in Lösung entweder eine Furanose- oder eine Pyranoseform. Zucker mit sieben oder mehr C-Atomen liegen in Lösung sowohl in ihrer Pyranose- als auch in ihrer Furanoseform vor (Lehmann, 1976). Nach Trimethylsilylierung von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose lag das Per-O-Trimethylsilyl-Derivat zu 47% in der β -Furanose-, zu 35% in der α -Furanose-, zu 14% in der α -Pyranose- und zu 4% in der β -Pyranoseform vor (Irvine et al, 1992). Es besteht die Möglichkeit, dass eine der in wässriger Lösung im Gleichgewicht auftretenden, Pyranose- oder Furanoseformen eine höhere Wechselwirkung mit der stationären Phase der Aktivkohlesäule und der Carbo-Pac-PA100-Säule aufweist und so 2-D-glycero-D-ido-Oktulose über einen längeren Zeitraum von den Säulen eluiert.

Eine aktivierte Form der C8-Ketose, 2-D-glycero-D-ido-Oktulose-8-P, zeigt bei 2D-dünnschichtchromatographischen Untersuchungen (3.5) ebenfalls ein ungewöhnliches Verhalten. Die Substanz zeigte in der ersten Dimension (Laufmittel GW3) ein normales Fließverhalten. In der zweiten Dimension wurde 2,5% Phenylboronsäure zur besseren Trennung von epimeren Zuckerphosphaten wie Ribose-5-P und Arabinose-5-P oder 2-D-glycero-D-ido-Oktulose-8-P und D-glycero-D-altro-Oktulose-8-P zugesetzt, da einige Zuckerphosphate wie Ribose-5-P und 2-D-glycero-D-ido-Oktulose-8-P stabile Komplexe mit Boronat bilden, was ihnen eine höhere Mobilität verleiht. 2-D-glycero-D-ido-Oktulose-8-P zeigte eine wesentlich erhöhte Mobilität in der zweiten Dimension und zusätzlich einen in die Länge gezogenen Spot, ganz im Gegensatz zu allen anderen getesteten Zuckerphosphaten, die einen definierten Spot auf den Nitrozelluloseplatten hinterließen (3.5). Kapuscinski et al.

(1985), die Phenylboronsäure als Zusatz zur Trennung der C5-Epimere 2-D-glycero-D-ido-Oktulose-8-P und D-glycero-D-altro-Oktulose-8-P benutzten, beobachteten ebenfalls bei 2-D-glycero-D-ido-Oktulose-8-P-Phenylboronsäure-Komplexen einen langgezogenen Spot. Dieser kann ebenfalls durch die unterschiedliche Interaktion der Erscheinungsformen von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose in den 2-D-glycero-D-ido-Oktulose-8-P-Phenylboronsäure-Komplexen erklärt werden. 2-D-glycero-D-ido-Oktulose-8-P zeigt, genau wie D-glycero-D-altro-Oktulose-8-P, einen definierten Spot in der ersten Dimension. Aufgrund des hochpolaren Laufmittels könnten hier eine Erscheinungsform von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose-8-P, die Pyranose- oder die Furanoseform, bevorzugt werden. Durch die Bildung eines stabilen Komplexes ändert sich die chemische Umgebung eines Stoffes und somit auch die Gleichgewichtslage der Erscheinungsformen.

Experimente mit genau definierten Mengen des hergestellten 2-D-glycero-D-ido-Oktulose-Standards (3.1) und des benutzten internen Standards Xylitol zeigten, dass mittels GC/FID eine Quantifizierung von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose im Bereich von 2 bis 25 ng 2-D-glycero-D-ido-Oktulose und 5 ng Xylitol pro Probelauf sehr gut mit den eingewogenen Mengen korreliert (Tab.3-1). Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurden deshalb quantitative Analysen von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose mittels GC/FID durchgeführt.

4.4 Untersuchungen zum Syntheseweg von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose in *Craterostigma plantagineum* während der Wiederbewässerungsphase

Durchgeführte Eintrocknungs- und Wiederbewässerungsexperimente verdeutlichten, dass 2-D-glycero-D-ido-Oktulose eine Speicherform von Saccharose in *C. plantagineum* darstellt und bei Bedarf die beiden Substanzen im Blattgewebe der Pflanze ineinander überführt werden können.

Vom Blattgewebe in den ersten 24 h der Wiederbewässerung aufgenommene ^{14}C -u-Saccharose oder ^{14}C -u-Glukose wird innerhalb der ersten 80 h zu fast 85% in die Speicherform 2-D-glycero-D-ido-Oktulose umgewandelt. Im Wurzelgewebe hingegen wird während der ersten 24 h vom Wurzelgewebe der Pflanze aufgenommene ^{14}C -u-Saccharose dort gespeichert und langsam in höhere Zucker der Raffinoseserie (Raffinose und Stachyose) eingebaut (3.3.1.2). Es wurde keine Umwandlung von Saccharose in 2-D-glycero-D-ido-Oktulose im Wurzelgewebe der Pflanze beobachtet.

Die Metabolisierung von Saccharose und die Synthese von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose im Blattgewebe geschehen zeitgleich. Auch die Abbau- und Syntheseraten korrelieren sehr gut

untereinander (3.3.1.1) und mit der Migration der eingesetzten Radioaktivität von Saccharose zu 2-D-glycero-D-ido-Oktulose. Aus diesem Grund wurde ein einfacher und schneller Syntheseweg von Saccharose zu 2-D-glycero-D-ido-Oktulose erwartet. Die Konfiguration der C3- bis C7-Position von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose lässt zwei einfache Synthesewege zu. Der erste führt über eine Transketolasereaktion, der zweite über eine Aldolasereaktion (Abb. 4-1)

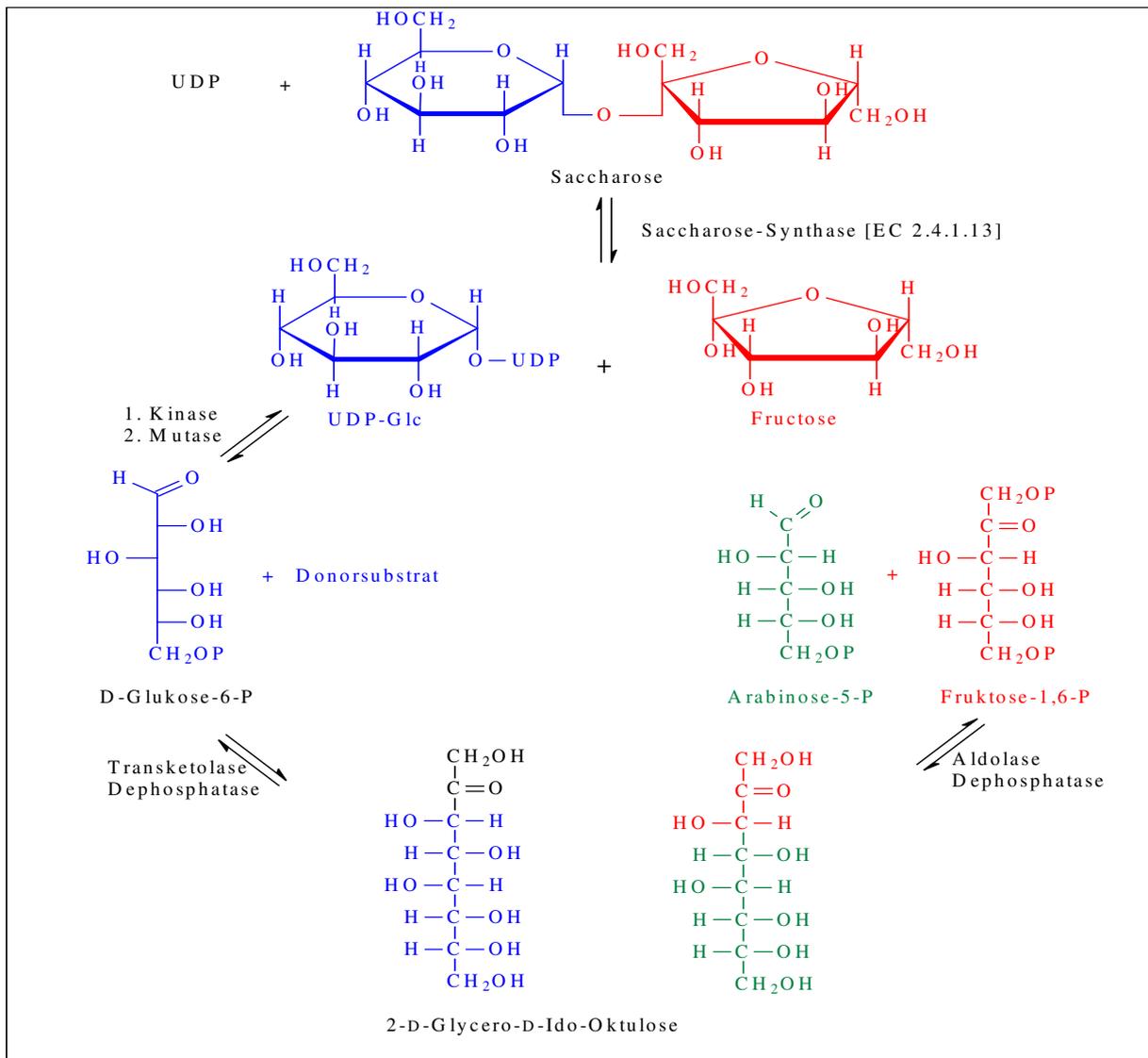


Abb.4-1: Mögliche Synthesewege von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose über eine Transketolase- oder eine Aldolasereaktion.

In Pflanzen wird die Spaltung von Saccharose hauptsächlich durch zwei Enzyme katalysiert: Zum einen Invertase [EC 3.2.1.26], die Saccharose in die beiden Monosaccharide Glukose und Fructose spaltet, und zum anderen Saccharose-Synthase [EC 2.4.1.13], die die reversible Spaltung von Saccharose in UDP-Glukose und Fructose katalysiert. Es wird heute

angenommen, dass Saccharose-Synthase *in vivo* primär dem Abbau von Saccharose dient (Winter et al., 1997). Die Synthese von Saccharose wird vornehmlich von Saccharose-Phosphat-Synthase betrieben (Ingram, 1997). Während Invertase im allgemeinen mit Zellwachstum in Verbindung gebracht wird, gibt es Hinweise, dass Saccharose-Synthase auch eine Rolle beim Wiedereinschleusen von Saccharose in den Metabolismus und bei Antworten auf Trockenheit und Kälte spielt (Sturm et al. 1999). In *C. plantagineum* wurde eine starke Akkumulation von Saccharose-Synthase während der Dehydrierungsphase und in den ersten 15 h der Rehydrierungsphase der Pflanze beobachtet (Kleines, 1999). Aus diesen Gründen wurde der vermutete Syntheseweg in Abb. 4-1 mit der Spaltung von Saccharose durch die Saccharose-Synthase begonnen.

Um zu entscheiden, welcher der beiden Synthesewege der Hauptsyntheseweg ist, wurden radioaktive Markierungsexperimente mit ^{14}C -6-Glukose und ^{14}C -1-Glukose während der Wiederbewässerung durchgeführt. Die gebildete 2-D-glycero-D-ido-Oktulose wurde nach 80 h massenspektrometrisch untersucht (3.3.2 und 3.3.3). Es kann davon ausgegangen werden, dass der überwiegende Teil der in trockenem Blattgewebe vorhandenen Saccharose innerhalb dieser Zeitspanne ohne Nebenprodukte in 2-D-glycero-D-ido-Oktulose umgewandelt wird (Abb.3-17). Durchgeführte Wiederbewässerungsexperimente mit ^{14}C -1-Glukose zeigten bei MS-Analysen der gebildeten 2-D-glycero-D-ido-Oktulose radioaktiv markierte MS-Fragmente, die die Positionen C3 bis C6 beinhalten (3.3.3). Bei einer Transketolasereaktion entspricht die C1-Position von Glukose der C3-Position in 2-D-glycero-D-ido-Oktulose. Wurde ^{14}C -6-Glukoselösung zur Wiederbewässerung verwendet, konnte eine radioaktive Markierung der C8- oder C7-Position bei der gebildeten 2-D-glycero-D-ido-Oktulose nachgewiesen werden. Aufgrund der Konfiguration in den Positionen C4 bis C7 in 2-D-glycero-D-ido-Oktulose muss im Fall einer Transketolasereaktion Glukose oder eine aktivierte Form von Glukose (UDP-Glukose oder Glukose-6-P) als Akzeptorsubstrat fungieren. In diesem Fall entspricht die C6-Position von Glukose nach der Übertragungsreaktion der C8-Position der gebildeten 2-D-glycero-D-ido-Oktulose (3.3.2). Es kann im Fall einer Aldolasereaktion argumentiert werden, dass das hier benötigte Akzeptorsubstrat Arabinose-5-P aus UDP-Glukose gebildet werden kann und somit auch bei einer Aldolasereaktion die C8 Position der gebildeten 2-D-glycero-D-ido-Oktulose markiert wäre. Um die radioaktiv markierte C6-Aldolase ^{14}C -6-Glukose in die radioaktiv markierte C5-Aldolase ^{14}C -5-Arabinose zu transformieren, wären jedoch mehrere Isomerase-, Aldolase- und Transketolasereaktionen nötig.

Zur weiteren Untersuchung des Syntheseweges von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose wurden Blätter von *C. plantagineum*-Pflanzen, die mit ^{14}C -6-Glukose und ^{14}C -1-Glukose wiederbewässert wurden, nach 26 h und 52 h einer Neutralzucker- und einer Phosphatzuckerextraktionen unterworfen. Nach 26 h wurden 27% und nach 52 h wurden 72% der aufgenommenen Radioaktivität in der gebildeten 2-D-glycero-D-ido-Oktulose nachgewiesen. Die nach 26 h und 52 h isolierten Phosphatzucker wurden mittels zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie (DC) aufgetrennt und identifiziert. In Phosphatzucker-extraktionen nach 26 h Wiederbewässerung wurde radioaktiv markierte Glukose-6-P, Fruktose-6-P und 2-D-glycero-D-ido-Oktulose-8-P identifiziert. Extraktionen nach 52 h zeigten radioaktive Markierungen von Glukose-6-P, Fruktose-6-P, Fruktose-1,6-P₂ und 2-D-glycero-D-ido-Oktulose-8-P. Die Substanzen wurden durch Literaturvergleich ihrer R_f-Werte und durch die Co-Auftragung der radioaktiv markierten Phosphatzucker mit den entsprechenden Standards identifiziert (3.5). Der benutzte 2-D-glycero-D-ido-Oktulose-8-P-Standard wurde durch Isolierung von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose-8-P aus einer bereits in der Literatur beschriebenen Reaktion mit Transketolase aus Hefe gewonnen (3.6.7.2.1; Arora et al., 1988). Neben den identifizierten Phosphatzuckern wurde eine weitere, radioaktiv markierte Substanz gefunden. UDP-Glukose, ein Produkt der vermuteten Saccharosespaltung, eluierte von einer DEAE-Säule bei einer Ammoniumtetraboratkonzentration von 0,55 M (3.5). In diesem Konzentrationsbereich wurden bereits die Dünnschichtchromatographie störende, anorganische Anionen mit eluiert. Es besteht die Möglichkeit, dass es sich bei der unbekannt Substanz um UDP-Saccharose handelt. Über die reversible Spaltung von UDP-Saccharose durch Saccharose-Synthase [EC 2.4.1.13] könnte ein entsprechender Standard für UDP-Saccharose hergestellt werden.

Glukose-6-P und 2-D-glycero-D-ido-Oktulose-8-P sind Intermediate einer Transketolase katalysierten Synthese von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose. Nach 52 h Wiederbewässerung konnte zusätzlich die Markierung von Fruktose-1,6-P₂ nachgewiesen werden, dem möglichen Substrat einer Transaldolasereaktion. Es konnte jedoch keine Markierung anderer, wichtiger Intermediate einer Transaldolase oder Aldolase katalysierten Synthese von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose wie Arabinose-5-P, dem notwendigen Akzeptorsubstrat einer Aldolasereaktion bzw. einer Transaldolasereaktion oder 2-D-glycero-D-ido-Oktulose-1,8-P₂, dem Produkt einer dieser Reaktionen, nachgewiesen werden (3.5). Damit kann eine Aldolasereaktion, die zur Synthese von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose während der Wiederbewässerungsphase führen würde, nahezu ausgeschlossen werden. Die Markierung von Fru-1,6-P₂ lässt darauf schließen,

dass die Glykolyse nach 52 h Wiederbewässerung wieder angelaufen ist, da Fruktose-1,6-P₂ unter anderem ein wichtiges Intermediat dieses Kohlehydratstoffwechsels ist.

Es wurde gezeigt, dass unter Verwendung von ¹⁴C-u-Saccharose und ¹⁴C-u-Glukose ein nahezu vollständiger Einbau der Radioaktivität in 2-D-glycero-D-ido-Oktulose während der Wiederbewässerung erfolgte. Glukose dient in Form von Glukose-6-P einer Transketolasereaktion als Akzeptorsubstrat. Weiterhin muss jedoch auch die aus ¹⁴C-u-Saccharose gebildete, radioaktiv markierte Fruktose in 2-D-glycero-D-ido-Oktulose eingebaut werden. Dies kann auf zwei Arten geschehen. Fruktose kann in Form von Fruktose-6-P als Donorsubstrat für eine Transketolasereaktion dienen (3.6.7). Fruktose-6-P wurde bereits als Donorsubstrat für Transketolasereaktionen mit Transketolasen aus Bakterien, Tieren und Pflanzen (Datta et al., 1961; Arora et al., 1988; Schenk et al., 1998) verwendet. Während der Wiederbewässerung mit ¹⁴C-1-Glukose wurde eine radioaktive Markierung von Fruktose-6-P beobachtet. Nach 80 h konnten massenspektrometrische Untersuchungen von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose aus mit ¹⁴C-1-Glukose wiederbewässerten Pflanzen eine radioaktive Markierung der C3-Position, nicht aber eine gesicherte radioaktive Markierung der C1-Position der gebildeten 2-D-glycero-D-ido-Oktulose zeigen. Es ist möglich, dass das Verhältnis zwischen 2-D-glycero-D-ido-Oktulose, die an Position C1 markiert ist, und in der Pflanze in großen Mengen gebildeter, unmarkierter 2-D-glycero-D-ido-Oktulose zu klein ist, um in MS-Untersuchungen eine signifikante Veränderung im Isotopenverhältnis von Fragmenten, die die C1-Position beinhalten, hervorzurufen (3.3.3). In Wiederbewässerungsexperimenten mit ¹⁴C-u-Saccharose wurde nahezu die gesamte Radioaktivität in der gebildeten 2-D-glycero-D-ido-Oktulose wiedergefunden. Wäre Fruktose-6-P das Donorsubstrat der Reaktion, würde ¹⁴C-u-D-Erythrose-4-P entstehen, dass ebenfalls in 2-D-glycero-D-ido-Oktulose eingebaut werden müsste. Es konnte in Phosphatzuckerextraktionen aus Pflanzen, die mit ¹⁴C-6-Glukose wiederbewässert wurden, keine radioaktiv markierte D-Erythrose-4-P nachgewiesen werden. Die zweite Möglichkeit, Fruktose aus ¹⁴C-u-Saccharose in 2-D-glycero-D-ido-Oktulose einzubauen, besteht in der Umwandlung von Fruktose in Glukose-6-P. In diesem Fall wäre die detektierte, radioaktiv markierte Fruktose-6-P ein Intermediat dieser Umwandlung. Das Donorsubstrat der Transketolasereaktion müsste dann aus einer anderen Quelle stammen. Neben Fruktose-6-P (C6-Körper) und dem Standardsubstrat der Transketolasereaktion Xylulose-5-P (C5-Körper) kommen L-Erythrose (C4-Körper) und β-Hydroxypyruvat (C3-Körper) als einfache Donorsubstrate in Frage. β-Hydroxypyruvat ist ein Intermediat der Serinsynthese. Es konnten jedoch keine größeren Konzentrationen der α-Ketosäure im

Blattgewebe von *C. plantagineum* während der Wiederbewässerung detektiert werden (3.8). Es konnte bisher auch kein gesicherter Hinweis gefunden werden, dass eines der anderen möglichen Substrate an der Synthese von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose beteiligt ist.

Die obigen Beobachtungen zeigen, dass der Hauptsyntheseweg von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose aus Saccharose während der Wiederbewässerung über eine Transketolasereaktion verläuft. Das Akzeptorsubstrat dieser Reaktion ist Glukose-6-P. Über das Donorsubstrat kann zu diesem Zeitpunkt noch keine genaue Aussage getroffen werden. Ein weiteres Indiz für einen Syntheseweg, der eine Transketolasereaktion beinhaltet, ist die temporäre Expression von zwei Transketolase kodierenden Transkripten in *C. plantagineum* während der Wiederbewässerung.

4.5 Proteinchemische Untersuchungen aufgereinigter Transketolase aus unbehandeltem und wiederbewässertem Blattgewebe von *Craterostigma plantagineum*

Neben einem konstitutiv expremierten, Transketolase kodierenden Transkript (tkt3) wurden zwei spezifisch während der Wiederbewässerungsphase von *C. plantagineum* expremierte Transkripte mit hohen Homologien zu bereits bekannten Transketolasegenen aus anderen Spezies entdeckt (Bernacchia et al., 1995). Ein in dieser Arbeit verwendetes polyklonales Antiserum zur Detektion von Transketolase wurde mittels eines Fusionsproteins aus Glutathion S-Transferase und einem 975 bp langem Fragment aus tkt10 von Gerhardt Schwall (1995) hergestellt. Das Fusionsprotein enthielt kodierende Bereiche für substrat- und cofaktorbindende Domänen (Bernacchia et al., 1995). Aus diesem Grund kann das Antiserum die verschiedenen Transketolaseformen nicht unterscheiden. Das Antiserum detektiert auch Transketolasen aus anderen Organismen wie Kartoffel, Mais und Tomate (Schwall, 1995).

Aktive Transketolase konnte sowohl in Aufreinigungen aus unbehandeltem als auch aus 28 h wiederbewässertem Blattgewebe von *C. plantagineum* extrahiert werden. Die Gesamttransketolaseaktivität in 28 h wiederbewässertem Blattgewebe bezogen auf das Trockengewicht der extrahierten Biomasse betrug dabei 40% der Gesamttransketolaseaktivität unbehandelter Blätter (3.6.1). Nach einem letztem Aufreinigungsschritt über eine Mono-Q-Säule wurde Transketolase aus unbehandelten und 28 h wiederbewässerten Blättern in je zwei Fraktionen eluiert. Das Molekulargewicht von Transketolase aus der ersten Fraktion konnte in SDS-PAGE auf 73 kDa festgelegt werden, in der zweiten Fraktion wurden zwei Transketolasebanden mit 73 kDa und 75 kDa detektiert (3.6.2; Schwall, 1995). Die Möglichkeit, dass es sich bei den drei unterschiedlichen Banden um Aufreinigungsartefakte

handelt, wurde bereits von Schwall (1995) widerlegt. Hinweise, dass Transketolase in Form von Transketolase-Transaldolase-Komplexen von Ionentauschersäulen eluiert (Wood, 1981) und so zu mehreren Banden führen kann, konnten hier durch Transaldolase- und Aldolaseaktivitätsmessungen der einzelnen Aufreinigungsschritte ebenfalls widerlegt werden. Bereits nach der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung konnte keine Kontamination durch Aldolaseaktivität in Fraktionen mit Transketolaseaktivität mehr festgestellt werden (3.6.2). Untersuchungen zu posttranslationalen Modifikationen zeigten, dass es sich bei Transketolase aus *C. plantagineum* nicht um Glykoproteine handelt. *In vivo*-Phosphorylierungsexperimente ergaben weiterhin keine Hinweise auf eine Phosphorylierung, die einen regulatorischen Einfluss auf Transketolase haben könnte (Schwall, 1995). Aus Southernblotexperimenten (Bernacchia et al., 1995) und Sequenzdaten (Schwall, 1995) ist bekannt, dass mindestens zwei bis drei verschiedene Gene der tkt3-Klasse existieren. Wie aus Protein- und Nukleinsäuresequenzdaten hervorgeht, scheint es sich bei den Transketolaseproteinen um kernkodierte, chloroplastische Proteine zu handeln, die ein N-terminales Signalpeptid für den Chloroplastenimport besitzen (Bernacchia et al., 1995; Schwall, 1995). Die Expression von verschiedenen Genen der tkt3-Familie (Schwall, 1995) oder unterschiedliche Abspaltungen des Signalpeptides bzw. einzelner Aminosäuren (Krishna et al., 1993) könnten das Auftreten der drei Banden in unbehandeltem und auch in wiederbewässertem Blattgewebe erklären (Schwall, 1995). Es wird angenommen, dass die Proteinbande bei 75 kDa das für die Chloroplasten bestimmte TKT3-Transketolaseprotein einschließlich des für den Transport kodierende Signalpeptids zeigt (Schwall, 1995).

Zur Charakterisierung der aufgereinigten Transketolase aus unbehandeltem und 28 h wiederbewässertem Blattgewebe wurden die K_M -Werte für die Substrate Ribose-5-P und Xylulose-5-P bestimmt (3.6.3). Die Substrate entstammen einer Transketolasereaktion aus dem Calvin-Zyklus. Es konnte kein signifikanter Unterschied in den K_M -Werten zwischen isolierter Transketolase aus unbehandeltem und wiederbewässertem Blattgewebe festgestellt werden (3.6.3). Untersuchungen der einzelnen Mono-Q-Fractionen I und II und der vereinten Fractionen jeweils aus unbehandeltem als auch aus 28 h wiederbewässertem Blattgewebe ergaben K_M -Werte für Ribose-5-P von 1,8 mM bis 1,9 mM. Die bestimmten K_M -Werte für Xylulose-5-P lagen zwischen 0,11 mM und 0,14 mM. Die ermittelten Werte korrelieren gut mit Literaturdaten für Transketolase aus unbehandelten *C. plantagineum*-Pflanzen (Schwall, 1995). Hier wurde der K_M -Wert für Ribose-5-P mit 1,6 mM für Mono-Q-Fraktion I bzw. 2,0 mM für Mono-Q-Fraktion II und der K_M -Wert für Xylulose-5-P mit 0,11 mM angegeben (Schwall, 1995). Die ermittelten Werte liegen gleichfalls in der Größenordnung von bereits

charakterisierten Transketolasen aus anderen Organismen wie Spinat, Mais, Paprika, *S. cerevisiae*, *S. utilis*, *E. coli*, Rattenleber, menschlichen Erythrocyten und Leukocyten (Datta et al., 1961; Wood, 1985; Sprenger et al., 1995; Bouvier et al., 1998; Gerhardt et al., 2003). Die K_M -Werte für Ribose-5-P liegen dabei in einem Bereich von 0,4 mM bis 1,4 mM. Damit liegen die K_M -Werte von Transketolase aus *C. plantagineum* für Ribose-5-P bis zu einem Faktor 5 höher als in anderen charakterisierten Systemen. Transketolase aus *C. plantagineum* weist für Xylulose-5-P K_M -Werte von 0,11 mM bis 0,14 mM auf und liegen im Bereich der für Transketolasen aus anderen Organismen angegebenen K_M -Werte für dieses Substrat von 0,06 mM bis 0,2 mM.

Das pH-Optimum der Transketolaseaktivität lag bei Transketolase aus unbehandeltem und 28 h wiederbewässertem Blattgewebe jeweils zwischen pH 7,5 und pH 8 (3.6.4). Transketolasen aus *S. cerevisiae* und Spinat zeigen ein ähnliches pH-Optimum bei pH 7,6 bzw. 7,5 (Kobori et al., 1992). Oberhalb von pH 8 ist ein drastischer Abfall der Aktivität von Transketolase aus *C. plantagineum* zu beobachten. Andere Transketolasen zeigen gerade hier ihr pH-Optimum. So liegt das pH-Optimum von Transketolase aus Weizenblättern zwischen pH 8 und pH 9 und von Transketolase aus *E. coli* zwischen pH 8 und pH 8,5 (Murphy et al., 1982; Sprenger et al., 1995).

Theoretisch kommt jede 2-Ketose als Donorsubstrat für eine Transketolasereaktion in Frage, jedoch zeigen Transketolasen eine hohe Selektivität in Bezug auf Ketosen mit einer *D-threo*-Konfiguration (Kobori et al., 1992; Nilsson et al., 1997; Fiedler et al., 2001). Transketolasen aus *C. plantagineum* bilden keine Ausnahme. Aktivitätstests mit Ribose-5-P und Ribulose-5-P zeigten eine Transketolaseaktivität erst nach Zugabe einer Ribulose-5-Phosphat-3-Epimerase, die Ribulose-5-P in ihr Epimer Xylulose-5-P, das eine *D-threo*-Konfiguration besitzt, umwandelt. Die möglichen natürlichen Donorsubstrate werden so stark eingeschränkt. Neben *D*-Xylulose-5-P (C5-Körper) sind *D*-Fruktose-6-P (C6-Körper) und *D*-Sedoheptulose-7-P (C7-Körper) mögliche Donorsubstrate für eine Transketolase katalysierte Synthese von 2-*D*-glycero-*D*-ido-Oktulose. Beide Substanzen weisen eine *D-threo*-Konfiguration an ihren C3- und C4-Positionen auf. Weitere mögliche Donorsubstrate sind β -Hydroxypyruvat (C3-Körper), Dihydroxyaceton-P (C3-Körper) und *L*-Erythrulose-4-P (C4-Körper). Diese Substanzen besitzen jedoch keine *D-threo*-Konfiguration, da ihnen zwei bzw. ein achirales Zentrum fehlen. Bis auf β -Hydroxypyruvat und Dihydroxyaceton-P handelt es sich bei allen aufgezeigten Substraten um aktivierte Saccharide. Neben Xylulose-5-P ist aufgereinigte Transketolase aus unbehandeltem und wiederbewässertem Blattgewebe von *C. plantagineum* in der Lage, Fruktose-6-P und β -Hydroxypyruvat als Donorsubstrat zu akzeptieren (3.6.7.1.1).

Auch andere pflanzliche Transketolasen und Transketolasen aus Pilzen akzeptieren Fruktose-6-P und β -Hydroxypyruvat als Donorsubstrate (Datta et al., 1961; Bolte et al., 1987; Arora et al., 1987; Fiedler et al., 2001). Dihydroxyaceton-P zeigte bei Transketolase aus *C. plantagineum* keine Substrateigenschaften. Diese Beobachtung deckt sich mit Literaturdaten von Transketolase aus Spinat und Hefe (Datta et al., 1961; Arora et al., 1987). L-Erythrulose-4-P wurde nicht getestet. Es existieren keine Literaturdaten über die Möglichkeit, L-Erythrulose-4-P als Donorsubstrat für eine Transketolasereaktion zu verwenden. Ein Produkt einer Transketolasereaktion mit L-Erythrulose-4-P wäre Glycolaldehyd-P.

Untersuchungen von Transketolasereaktionen mit einer Transketolase aus Spinat-Chloroplasten und β -Hydroxypyruvat als Donorsubstrat (Arora et al., 1987) zeigten, dass ein sinnvolles Verhältnis von Akzeptorsubstrat zu Donorsubstrat bei dieser Reaktion 1:3 beträgt. Auch für Transketolase aus *C. plantagineum* konnte dies gezeigt werden (3.6.7.1.2). Für die im folgenden durchgeführten Synthesen von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose wurde β -Hydroxypyruvat als Donorsubstrat verwendet. Obwohl die Reaktionsgeschwindigkeit mit β -Hydroxypyruvat ca. 25mal geringer ausfällt als mit Xylulose-5-P (Bolte et al., 1987), hat die β -Hydroxy- α -Ketosäure vier Vorteile gegenüber dem Standardsubstrat Xylulose-5-P:

- Aus der reversiblen Transketolasereaktion wird durch den Einsatz von β -Hydroxypyruvat als Donorsubstrat eine irreversible Reaktion (Abb.4-2).
- Die Handhabung ist einfacher: Xylulose-5-P muss in Form von Ribulose-5-P vorgelegt werden, die erst durch eine Epimerase in das Donorsubstrat der Transketolasereaktion umgewandelt werden muss.
- Das Standard-Donorsubstrat Xylulose-5-P wird in Form von Ribulose-5-P vorgelegt, die erst durch eine Epimerase in das Donorsubstrat überführt wird. Eventuelle Kontamination durch Pentose-5-P-Isomerase, die ebenfalls in Chloroplasten vorkommt, wird bei Verwendung von Ribulose-5-P einen Teil in Ribose-5-P, das Standard-Akzeptorsubstrat, umwandeln. So kann es bei Verwendung eines anderen Akzeptorsubstrates als Ribose-5-P zur Bildung von zwei Produkten oder, je nach Reaktionsgeschwindigkeiten der einzelnen Substrate, hauptsächlich zur Bildung von Sedoheptulose-7-P, dem Produkt der Standardreaktion von Transketolasen, kommen. Eine zweite Kontaminationsquelle für Isomerase ist die notwendige Ribulose-5-Phosphat-3-Epimerase (Bolte et al., 1987).

- Ein weiterer Punkt ist der Kostenfaktor. β -Hydroxypyruvat ist wesentlich billiger als Ribulose-5-P und somit besser für größere Syntheseansätze geeignet.

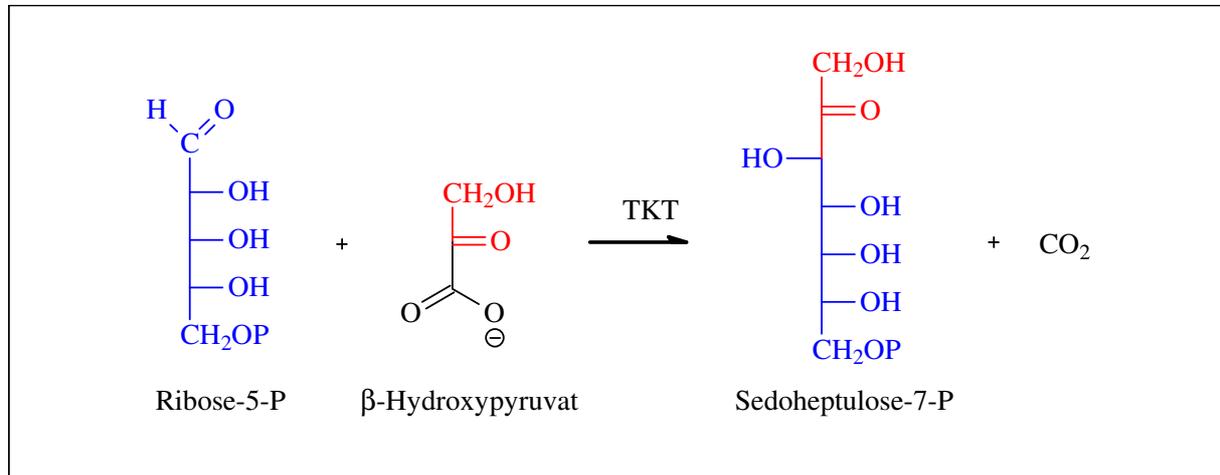


Abb.4-2: Irreversibler Reaktionsverlauf einer Transketolasereaktion mit β -Hydroxypyruvat als Donorsubstrat

4.6 Akzeptorsubstratspezifität von Transketolase aus unbehandeltem und wiederbewässertem Blattgewebe von *Craterostigma plantagineum*

Vor dem Hintergrund der bereits beschriebenen Umwandlung von Saccharose in 2-D-glycero-D-ido-Oktulose während der Wiederbewässerung von *C. plantagineum* wurden Ansätze zur transketolasekatalysierten Synthese von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose-8-P angesetzt. Hier zeigte sich ein deutlicher Unterschied in der Akzeptorsubstratspezifität zwischen isolierter Transketolase aus unbehandeltem und 28 h wiederbewässertem Blattgewebe von *C. plantagineum*. Transketolasen bevorzugen Akzeptorsubstrate mit einer C2-D-Konfiguration (Kobori et al., 1992; Nilsson et al., 1997) wie sie unter anderem im Standardsubstrat Ribose-5-P, Glycerinaldehyd-3-P, Erythrose-4-P und Glukose-6-P zu finden ist. Glukose-6-P muss, aufgrund der Konfiguration der C3- bis C7-Position von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose, das Akzeptorsubstrat einer Transketolase katalysierten Synthese von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose-8-P sein. Transketolase aus unbehandelten Blättern ist nicht in der Lage, Glukose-6-P als Akzeptorsubstrat akzeptieren (3.6.7.2.4). Darüber hinaus inhibiert Glukose-6-P die Transketolasereaktion (3.6.8). Die inhibitorische Funktion von Glukose-6-P wurde bisher nur für Transketolasen aus *C. utilis* (Wood, 1981), Rattenleber (Wood, 1985) und *C. plantagineum* (Schwall, 1995) beschrieben. Transketolase aus *E. coli* zeigte keine Inhibition durch Glukose-6-P, aber auch hier besaß der Phosphatzucker keine

Substrateigenschaften (Sprenger et al., 1995). Transketolasen aus Spinat und *S. cerevisiae* hingegen akzeptieren Glukose-6-P als Akzeptorsubstrat (Datta et al., 1961; Arora et al., 1988; Bolte et al. 1987; Kobori et al. 1992), wenn auch die Reaktionsgeschwindigkeiten um einen Faktor 4 bis 8 kleiner als mit Ribose-5-P sind. Die Inhibitionsversuche von Transketolase aus *C. plantagineum* mit Glukose-6-P zeigten, dass sich die K_M -Werte von Xylulose-5-P mit ansteigender Glukose-6-P-Konzentration nicht ändern. Die V_{max} -Werte hingegen sinken mit zunehmender Glukose-6-P-Konzentration ab. Diese Beobachtungen lassen auf eine nicht-kompetitive Hemmung der Transketolase durch Glukose-6-P schließen (3.6.8). Aktivitätstests mit um einen Faktor 10 (17 mM) und 50 (85 mM) erhöhten Ribose-5-P-Konzentrationen und 5,3 mM Glukose-6-P-Konzentration zeigten keine Erhöhung der V_{max} -Werte, was ebenfalls für eine nicht-kompetitive Hemmung spricht. Für Transketolase aus *C. utilis* wurde eine gemischte kompetitive Hemmung vorgeschlagen (Wood, 1981). Arabinose-5-P, das C2-Epimer des Standardsubstrates Ribose-5-P, gilt als Inhibitor für Transketolasen. So wird Transketolase aus *E. coli*, die nicht von Glukose-6-P inhibiert wird, von Arabinose-5-P kompetitiv gehemmt (Sprenger et al., 1995).

Aufgereinigte Transketolase aus 28 h wiederbewässerten Blättern von *C. plantagineum* katalysiert bei gleichen Glukose-6-P-Konzentrationen wie in Syntheseansätzen mit Transketolase aus unbehandelten Blättern die Übertragung einer C₂-Einheit von β -Hydroxypyruvat auf Glukose-6-P. Das entstandene Produkt konnte durch dünnschichtchromatographische Untersuchungen als 2-D-glycero-D-ido-Oktulose-8-P identifiziert werden. Nach einer Dephosphorylierung des entstandenen Produktes konnte mittels GC/FID-Untersuchungen 2-D-glycero-D-ido-Oktulose identifiziert werden (3.6.7.2.4). Durchgeführte Inhibierungstests mit aufgereinigter Transketolase aus 28 h wiederbewässerten Blättern von *C. plantagineum* zeigten ebenfalls eine nicht-kompetitive Inhibierung durch Glukose-6-P. Aktivitätstests mit Glukose-6-P als Akzeptorsubstrat und Transketolase aus 28 h wiederbewässertem Blattgewebe zeigten jedoch auch eine Transketolaseaktivität an, die um einen Faktor 30 geringer war als die gemessene Aktivität der Transketolase mit Ribose-5-P als Akzeptorsubstrat. Aufgereinigte Transketolase aus unbehandeltem Blattgewebe zeigte hingegen keine Aktivität mit Glukose-6-P (3.6.8; Tab.3-12). Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass es während der Wiederbewässerung von *C. plantagineum* zu einer Expression einer Transketolaseisoform kommt, die Glukose-6-P als Akzeptorsubstrat akzeptiert.

4.7 Isoformen von Transketolase aus *Craterostigma plantagineum*

In *C. plantagineum* konnte während der Wiederbewässerungsphase die Expression von tkt7- und tkt10-Transkripten beobachtet werden (Bernacchia et al., 1995). In 2D-PAGE wurden die 73/75 kDa-Doppelbanden von SDS-PAGE in mehrere Spots aufgetrennt. Unabhängig vom Elutionsverhalten an Ionentauschersäulen sind bereits verschiedene Formen von Transketolasen in Isoelektrofokussierungen beschrieben worden (Kaczmarek et al., 1983; Paoletti et al., 1986). In den durchgeführten 2D-PAGE konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Expression von Transketolase aus unbehandeltem und 28 h wiederbewässertem Blattgewebe festgestellt werden (3.7). In allen detektierten Transketolasespots von 2D-PAGE konnten mittels MALDI TOF-MS-Untersuchungen Hinweise auf die bereits von Schwall (1995) beschriebene Transketolase TKT3 gefunden werden. In Spot 2 (Abb.3-43) von 2D-PAGE von 28 h wiederbewässertem Blattgewebe konnten neben Hinweisen auf TKT3 auch 8 Massepeaks detektiert werden, die durch Datenbankabgleich (SWISSPROT) TKT10 zugeordnet werden konnten. Die Intensitäten der Massepeaks waren jedoch für eine Aminosäuresequenzierung nicht ausreichend. Mittels 2D-PAGE konnten keine Unterschiede zwischen der Expression von Transketolase aus unbehandeltem und 28 h wiederbewässertem Blattgewebe festgestellt werden. Die Transketolaseproteine scheinen während der Wiederbewässerung von *C. plantagineum* vorwiegend von tkt3 kodiert zu werden, obwohl die Transkriptmengen von tkt7 und tkt10 während der Wiederbewässerungsphase überwiegen (Schwall, 1995). Es gibt viele Fälle, in denen die detektierten Transkriptmengen nicht mit den detektierten Proteinmengen korrelieren. In *C. plantagineum* wurde während der Austrocknungsphase eine Diskrepanz zwischen der Transkriptmenge für das Saccharose-Synthase-Gen SS1 und der entsprechenden Proteinmenge festgestellt (Elster, 1994). In Spinat steigen das Aktivitätslevel und das Transkriptlevel einer Isoform von Ascorbat-Peroxidase als Antwort auf oxidativen Stress stark an, obwohl das Proteinlevel von Ascorbat-Peroxidase nur einen extrem geringen Anstieg zeigt (Yoshimura et al., 2000). In Keimlingen von Mais wurde gezeigt, dass unter anaeroben Bedingungen die Transkription eines Saccharose-Synthase-Gens stark induziert wird, jedoch keine Translation des entsprechenden Proteins beobachtet werden kann (McElfresh et al., 1988). All diese Beispiele deuten auf eine posttranskriptionale Regulation der entsprechenden Gene hin, die zumindest zum Teil auf der Ebene der Proteinsynthese, Proteinstabilität oder Enzymaktivierung liegt (Mittler et al., 1994). Wie es scheint, wird die Isoform TKT10 nur in sehr geringen Mengen synthetisiert, was eine Identifizierung erschwert. Die Transketolaseaktivität bezogen auf Glukose-6-P im Blattgewebe von *C. plantagineum* muss nicht groß sein. Um innerhalb von ca. 55 h (Abb.

3-16) die gesamte 2-D-glycero-D-ido-Oktulosemenge (ca. 3,2 g (13,3 mmol)) aus 78 g (FW) unbehandelten Blättern zu synthetisieren, reicht eine Transketolaseaktivität von durchschnittlich 4 U aus. Die Transketolaseaktivität bezogen auf Ribose-5-P betrug nach 28 h Wiederbewässerung 126 U (3.6.8). Die aufgrund von gemachten Beobachtungen (3.6.1) theoretisch berechnete Transketolaseaktivität nach 70 h Wiederbewässerung liegt bei ca. 280 U bezogen auf Ribose-5-P.

4.8 Subzelluläre Lokalisation von Transketolaseaktivität

Durchgeführte Zellfraktionierungen zur Lokalisierung von Transketolaseaktivität zeigten, dass mindestens zwischen 70% und 90% der Transketolaseaktivität (bezogen auf Ribose-5-P und Xylulose-5-P) von unbehandeltem und von 28 h wiederbewässertem Blattgewebe in den Chloroplasten lokalisiert ist (3.6.6). Es konnte auch in den jeweiligen cytosolischen Fraktionen Transketolaseaktivität gemessen werden. Der Nachweis von R-1,5-P₂-Carboxylase (RUBISCO), einem chloroplastenspezifischen Enzym, in SDS-PAGE der cytosolischen Fraktionen legt jedoch die Vermutung nahe, dass die gemessene cytosolische Transketolaseaktivität (zwischen 10% und 15% der gesamten gemessenen Aktivität) zum Teil oder komplett durch eine Kontamination aus zerbrochenen Chloroplasten hervorgerufen wurde. Aufreinigungen der Transketolase aus einer cytosolischen Fraktion, einer Fraktion aus zerbrochenen Chloroplasten und einer Fraktion aus ganzen Chloroplasten jeweils die Auftrennung von Transketolase nach der Mono-Q-Chromatographie in die bereits unter 4.5 beschriebenen Bandenmuster in SDS-PAGE.

Während Transketolasen aus Tieren und Pilzen im cytoplasmatischen Teil der Zellen lokalisiert sind, scheint die Transketolaseaktivität im photosynthetischen und nicht-photosynthetischen Pflanzengewebe hingegen in den Plastiden lokalisiert zu sein (Schnarrenberger et al., 1995; Debnam et al., 1999; Henkes et al., 2001; Gerhardt et al. 2003). Mit Ausnahme der beiden nicht konstitutiv expremierten Isoformen tkt7 und tkt10 aus *C. plantagineum* kodieren alle bis heute untersuchten, pflanzlichen Transketolasegene für Transketolasen mit einer N-terminalen, plastidkodierenden Signalsequenz (Bernacchia et al., 1995; Schnarrenberger et al., 1995; Flechner et al., 1996; Bouvier et al., 1998; Debnam et al., 1999; Henkes et al. 2001; Gerhardt et al. 2003).

Pflanzliche Transketolase ist unentbehrlich für den regenerativen Teil des Calvin-Zyklus, der in den Chloroplasten lokalisiert ist. Weiterhin ist Transketolase ein wichtiges Enzym des oxidativen Pentosephosphatweges. Die ersten beiden Schritte der Glukose-6-Phosphat-Oxidation, eine Dehydrogenasereaktion und eine Lactonasereaktion, können zwar auch im

Cytosol stattfinden, der komplette oxidative Pentosephosphat-Zyklus ist jedoch nur in den Chloroplasten möglich (Schnarrenberger et al., 1995). Die wichtige Rolle von Transketolase in diesem Primärstoffwechsel konnte an transketolasedefizienten Mutanten von *E. coli* und *S. cerevisiae* gezeigt werden. Die Mutanten waren auxotroph gegenüber Pyridoxin und aromatischen Aminosäuren (Schaaff et al., 1993; Zhao et al. 1994).

Der Nachweis einer möglichen cytosolischen Transketolase gestaltet sich schwierig, da bei Zellaufschlüssen immer auch Teile der Organellen zerbrechen und so die cytosolische Fraktion kontaminiert wird. Bisherige Untersuchungen zur Lokalisierung von Transketolase in der Zellstruktur konnten keinen sicheren Beweis für cytosolische Transketolasen in Pflanzengewebe erbringen (Feierabend et al., 1983). Bei Zellfraktionierungsexperimenten wurde im Rahmen dieser Arbeit aus diesem Grund ein Ausschlussverfahren gewählt. Bei diesen Experimenten wurden 2-D-glycero-D-ido-Oktulose-8-P-Syntheseansätze mit extrahierter Transketolase aus intakten Chloroplasten durchgeführt. Die so extrahierte Transketolase ist frei von cytosolischen Kontaminationen. Untersuchungen zeigten, dass es in Syntheseansätzen mit extrahierter Transketolase aus intakten Chloroplasten von unbehandeltem und 28 h wiederbewässertem Blattgewebe von *C. plantagineum* zu keiner Synthese von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose-8-P kommt. Chloroplastische Transketolase ist nicht in der Lage, Glukose-6-P als Akzeptorsubstrat zu akzeptieren (3.6.9). Die Isoform TKT3 konnte sowohl in unbehandeltem wie auch 28 h wiederbewässertem Blattgewebe nachgewiesen werden. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von Transketolaseaktivität zeigten, dass der größte Teil, wenn nicht gar die gesamte Transketolaseaktivität bezogen auf Ribose-5-P, in den Chloroplasten lokalisiert ist. Die Gensequenz von *tkt3* wird konstitutiv expremiert und das Genprodukt weist wahrscheinlich eine N-terminale, plastidkodierende Signalsequenz auf (Bernacchia et al., 1995). Aus diesen Gründen wird angenommen, dass die plastidische, konstitutiv expremierte Transketolase TKT3 aus *C. plantagineum* im Pentosephosphatweg und im Calvin-Zyklus involviert ist.

Durchgeführte 2-D-glycero-D-ido-Oktulose-8-P-Syntheseansätze mit teilweise aufgereinigter Transketolase aus cytosolischen Fraktionen von Zellfraktionierungsexperimenten aus 28 h wiederbewässertem Blattgewebe von *C. plantagineum* zeigten die Bildung eines Übertragungsproduktes (3.6.9). Nach einer erfolgten Dephosphorylierung der Phosphatzucker konnte mittels GC/MS-Analysen Glukose und 2-D-glycero-D-ido-Oktulose nachgewiesen werden. Transketolase aus cytosolischen Fraktionen von Zellfraktionierungsexperimenten aus unbehandeltem Blattgewebe zeigte keine Aktivität mit Glukose-6-P als Akzeptorsubstrat. In

C. plantagineum konnte während der Wiederbewässerung ausgetrockneter Pflanzen die Expression der Transkripte *tkt7* und *tkt10* nachgewiesen werden (Schwall, 1995). Während *tkt7* sowohl im Wurzel- als auch im Sprossgewebe nachgewiesen wurde, findet die Expression von *tkt10* nur im Sprossgewebe statt. Im Wurzelsystem von *C. plantagineum* kommt es zu keiner nennenswerten Umwandlung von Saccharose in 2-D-glycero-D-ido-Oktulose während der Wiederbewässerung (3.3.1.2). Weiterhin konnten keine Hinweise auf eine Translation von *tkt7* im Blattgewebe von *C. plantagineum* gefunden werden, mittels MALDI TOF-MS-Untersuchungen wurden jedoch Hinweise auf die Anwesenheit von TKT10 in wiederbewässertem Blattgewebe gefunden. Hier sind weitere Untersuchungen notwendig, es wird jedoch vermutet, dass TKT10 in der Konvertierung von Saccharose in 2-D-glycero-D-ido-Oktulose involviert ist und nicht am Pentosephosphatweg und Calvin-Zyklus. In Paprika (*Capsicum annuum* L.) wurde eine Transketolase nachgewiesen, die nicht an einem dieser beiden Primärstoffwechsel beteiligt ist. Neben einer plastidischen, konstitutiv exprimierten Transketolase (CapTKT1), die im Pentosephosphatweg und Calvin-Zyklus involviert ist, wurde eine zweite Transketolase (CapTKT2) identifiziert, die unter Verwendung der Standardsubstrate für Transketolase, Ribose-5-P und Xylulose-5-P, kaum Aktivität aufweist. CapTKT2 katalysiert dafür die irreversible Kondensation von Pyruvat (C2-Donorsubstrat) und D-Glyceraldehyd-3-P (C3-Akzeptorsubstrat). Die beiden Substrate von CapTKT2 sind Ausgangsstoffe der Synthese von Isopentyl-Phosphat, einer Vorstufe von Isoprenoiden (Bouvier et al., 1998). CapTKT1 ist dazu nicht in der Lage.

Transketolase aus cytosolischen Fraktionen aus Blattgewebe von 28 h wiederbewässerten *C. plantagineum*-Pflanzen katalysiert *in vitro* die Umsetzung von Glukose-6-P und β -Hydroxypyruvat in 2-D-glycero-D-ido-Oktulose-8-P. Aktivitätstests mit aufgereinigter, Ribose-5-P-3-Epimerase freier Transketolase aus wiederbewässertem Blattgewebe von *C. plantagineum* zeigten zudem eine Transketolaseaktivität mit Glukose-6-P als Akzeptorsubstrat. Chloroplastische Transketolase aus Blattgewebe wiederbewässerter *C. plantagineum*-Pflanzen akzeptiert Glukose-6-P nicht als Akzeptorsubstrat. Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass in *C. plantagineum* während der Wiederbewässerung eine Isoform gebildet wird, wahrscheinlich TKT10, die in der Synthese von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose aus Saccharose involviert ist. Ein weiterer Hinweis ist, dass den während der Wiederbewässerungsphase detektierten Transkripten *tkt7* und *tkt10* ein Signalpeptid für den Chloroplastenimport fehlt. Es kann vermutet werden, dass die Genprodukte, wenn vorhanden, wahrscheinlich cytosolischer Natur sind. Da Gene der *tkt3*-Familie hingegen Signalsequenzen für den Chloroplastenimport aufweisen, wird

angenommen, dass diese konstitutiv expremierten Isoformen im Pentosephosphatweg und im Calvin-Zyklus involviert sind. Ein weiteres Indiz für eine cytosolische Lokalisation der 2-D-glycero-D-ido-Oktulose-8-P Synthese ist, dass Saccharose, die während der Trockenperiode zum Schutz der Zellen trockenresistenter Organismen Glasphasen bildet, zum Zeitpunkt der Wiederbewässerung hauptsächlich im Cytosol lokalisiert ist.

Die Transketolaseaktivität bezogen auf Glukose-6-P ist sehr gering gegenüber der Aktivität bezogen auf R-5-P. Dies erklärt auch die gefundenen Inhibierungen von Transketolaseaktivität bezogen auf das Akzeptorsubstrat Ribose-5-P aus unbehandeltem und wiederbewässertem Blattgewebe von *C. plantagineum* durch Glukose-6-P. Die konstitutiv expremierte, chloroplastenspezifische TKT3, die in großen Mengen vorliegt, wird durch Glukose-6-P inhibiert. Die gemessene Transketolaseaktivität für Glukose-6-P als Akzeptorsubstrat betrug zur Zeit der höchsten Umwandlungsrate von Saccharose in 2-D-glycero-D-ido-Oktulose nur etwa 3% der Transketolaseaktivität für Ribose-5-P als Akzeptorsubstrat (3.6.7). Aufgrund der geringen Aktivität bezogen auf Glukose-6-P im Vergleich zur gefundenen Aktivität bezogen auf Ribose-5-P überwiegt der Aktivitätsverlust durch die Inhibierung, so dass auch Transketolase aus wiederbewässertem Blattgewebe eine starke Inhibierung aufweist.

5 Zusammenfassung

Die trockenolerante Wiederauferstehungspflanze *C. plantagineum* dient als Modellsystem zur Erforschung der molekularen Grundlagen der Trockenoleranz in höheren Pflanzen. Im Wurzelgewebe von *C. plantagineum* sind Zucker der Raffinoseserie (Stachyose, Raffinose und Saccharose) die Hauptzuckerkomponenten. Die Hauptzuckerkomponente in unbehandeltem Blattgewebe ist 2-D-glycero-D-ido-Oktulose mit ca. 40 mg/100 mg DW. Unter Trockenstress zeigen beide Gewebearten sehr differierende Zuckerhaushalte. Im Wurzelgewebe ist während der Eintrocknungsphase eine Metabolisierung von 40% bis 50% der Raffinoseseriezucker zu beobachten. Im Blattgewebe wird während der Eintrocknungsphase 2-D-glycero-D-ido-Oktulose fast vollständig zu Saccharose metabolisiert. Während der Wiederbewässerung wird die gebildete Saccharose wiederum in 2-D-glycero-D-ido-Oktulose umgewandelt. Im Wurzelgewebe der Pflanze ist keine Konvertierung von Saccharose in 2-D-glycero-D-ido-Oktulose zu beobachten. Aufgrund der in anderen Systemen nachgewiesenen protektiven Wirkung von Saccharose auf Proteine und Membranen wird ein direkter Zusammenhang zwischen dem beobachteten Zuckermetabolismus in *C. plantagineum* und dem Erwerb der Trockenoleranz vermutet.

Eintrocknungs- und Wiederbewässerungsexperimente mit *C. plantagineum* verwandten *Lindernia*-Arten zeigten, dass auch *Lindernia brevidens*, eine Bewohnerin subtropischer Regenwälder, trockenolerante Eigenschaften aufweist. Die Zuckerhaushalte im Blattgewebe von *L. brevidens* und *L. philcoxii* weisen große Parallelen zum Zuckerhaushalt im Blattgewebe von *C. plantagineum* auf. Die untersuchten *L. philcoxii*-Pflanzen besaßen jedoch nicht die Fähigkeit zur Trockenoleranz. Der Unterschied in den Zuckerhaushalten der getesteten Arten liegt in der gebildeten Menge Saccharose während der Eintrocknungsphase. *C. plantagineum*- und *L. brevidens*-Pflanzen wiesen im getrockneten Blattgewebe ca. 400 bzw. 180 mg/g DW Saccharose auf. In *L. philcoxii* konnte in getrocknetem Blattgewebe lediglich 17 mg/g DW des Disaccharides nachgewiesen werden.

Untersuchungen zur Metabolisierung von Saccharose zu 2-D-glycero-D-ido-Oktulose im Blattgewebe von *C. plantagineum* während der Wiederbewässerungsphase zeigten, dass die Synthese von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose über eine Transketolasereaktion mit Glukose-6-P als Akzeptorsubstrat verläuft. In säulenchromatographischer Aufreinigung konnte Transketolase aus unbehandeltem und 28 h wiederbewässertem Blattgewebe von *C. plantagineum* nach einem letzten Aufreinigungsschritt in zwei Fraktionen eluiert werden. SDS-PAGE zeigten eine Bande mit einem Molekulargewicht von 73 kDa in Fraktion I und

eine Doppelbande mit 73 und 75 kDa in Fraktion II. Beiden Fraktionen wurden in Aufreinigungen aus unbehandeltem und 28 h wiederbewässertem Blattgewebe gefunden. In 2D-PAGE-Analysen konnten die 73 kDa-Banden in mehrere Spots aufgetrennt werden, dabei konnten keine Unterschiede im Expressionsmuster von Transketolase aus unbehandeltem und 28 h wiederbewässertem Blattgewebe gefunden werden. MALDI TOF-MS-Untersuchungen zeigten in allen untersuchten Spots von Transketolaseaufreinigungen aus unbehandeltem und 28 h wiederbewässertem Blattgewebe Hinweise auf die Isoform TKT3. Das Transkript *tkt10* zeigt während der Wiederbewässerung der Pflanze eine starke Induktion (Bernacchia et al., 1995). MALDI TOF-MS-Untersuchungen von Spots aufgereinigter Transketolase aus 28 h wiederbewässertem Blattgewebe zeigten in einem der Hauptspots neben Massepeaks, die TKT3 zugeordnet wurden, Hinweise auf TKT10. Die Proteinmengen von TKT10 scheinen sehr gering zu sein und korrelieren nicht mit der starken Induktion des Transkripts *tkt 10* zu diesem Zeitpunkt.

Inhibierungsstudien zeigten sowohl für aufgereinigte Transketolase aus 28 h wiederbewässertem als auch aus unbehandeltem Blattgewebe eine nicht-kompetitive Hemmung durch Glukose-6-P, dem Akzeptorsubstrat einer Transketolase katalysierten Synthese von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose. Trotzdem konnte in *in vitro*-Syntheseansätzen mit aufgereinigter Transketolase aus 28 h wiederbewässertem Blattgewebe, Glukose-6-P und β -Hydroxypyruvat als Donorsubstrat eine Übertragungsreaktion einer C2-Einheit beobachtet werden. Transketolase aus unbehandeltem Blattgewebe ist hingegen nicht in der Lage, Glukose-6-P als Substrat zu akzeptieren. Die Glukose-6-P-Konzentration in den *in vitro*-Syntheseansätzen war zu gering, um eine komplette Inhibierung der Transketolase zu bewirken. Aktivitätstests und 2-D-glycero-D-ido-Oktulose-Syntheseansätzen von Zellkompartimentierungen aus unbehandeltem und 28 h wiederbewässertem Blattgewebe zeigten, dass die chloroplastenspezifische, konstitutiv expremierte Isoform TKT3 Glukose-6-P nicht als Akzeptorsubstrat akzeptiert und durch Glukose-6-P inhibiert wird. In 28 h wiederbewässertem Blattgewebe konnten Hinweise auf geringe Mengen von TKT10 gefunden werden. Da teilweise aufgereinigte Transketolase von cytosolischen Fraktionen, im Gegensatz zu chloroplastischen Fraktionen, aus 28 h wiederbewässertem Blattgewebe die Synthese von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose aus Glukose-6-P und β -Hydroxypyruvat katalysiert, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei TKT10 um eine nicht plastidische Isoform von Transketolase handelt, die im Syntheseweg von 2-D-glycero-D-ido-Oktulose während der Wiederbewässerung involviert ist.

6 Literatur

- Arora K., Collins J., McLeod J., Williams J. (1988)**, „Rapid methods or the high yield synthesis of carbon-13 enriched intermediates of the pentose-phosphate pathway“, *Biological Chemistry*, 369; 549-557.
- Asada S., Takano M., Shibasaki I. (1985)**, „The stabilization of proteins by osmolytes“, *Biophysical Journal*, 47; 411-414.
- Baker J., Steele C., Dure L. (1988)**, „Sequene and characterization of 6 *Lea* proteins and their genes from cotton.“, *Plant Molecular Biology*, 11; 277-291.
- Bartels D., Schneider K., Terstappen G., Piatkowski D., Salamini F. (1990)**, „Molecular cloning of abscisic acid-modulated genes which are induced during desiccation of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*.“, *Planta*, 181; 27-34.
- Bartels D., Hanke C., Schneider K., Michel D., Salamini F. (1992)**, „A desiccation-related Elip-like gene from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* is regulated by light and ABA.“, *EMBO Journal*, 11; 2771-2778.
- Bartels D., Nelson D. (1994)**, „Approaches to improve stress tolerance using molecular genetics“, *Plant Cell Environment*, 17; 659-667.
- Bartels D., Salamini F. (2001)**, „Desiccation tolerance in the resurrection plant *C. plantagineum*“, *Plant Physiology*, 127; 1346-1353.
- Batlett S., Grossman A., Chua N. (1982)**, „In vitro synthesis and uptake of cytoplasmically-synthesized chloroplast proteins“ In: „Methodes in chloroplast molecular biology“, Edelman (Ed.), Elsevier Biomedical Press; 1081-1091.
- Bergmeyer H. (1974)**, „Methods of Enzymatic Analysis“, Verlag Chemie Weinheim, 3. Aufl., Vol. 1-3.
- Bernacchia G., Schwall G., Lottspeich F., Salamini F., Bartels D. (1995)**, „The transketolase gene family of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*: differential expression during the rehydration phase.“, *EMBO Journal*, 14; 610-618.
- Bernacchia G., Salamini F., Bartels D. (1996)**, „Molecular Characterization of the Rehydration Process in the Resurrection Plant *Craterostigma plantagineum*.“, *Plant Physiology*, 111; 1043-1050.
- Bianchi G., Gamba A., Murelli C., Salamini F., Bartels D. (1991)**, „Novel carbohydrate metabolism in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*.“, *The Plant Journal*, 1; 355-359.

- Bianchi G., Gamba A., Murelli C., Salamini F., Bartels D. (1991a)**, „Low molecular weight solutes in desiccated and ABA-treated calli and leaves of *C. plantagineum*“, *Phytochemistry*, 31; 1917-1922.
- Bieger-Dose A., Dose K., Meffert R., Mehler M., Risi S. (1992)**, „Extreme dryness and DNA-protein cross-links“, *Advances in Space Research*, 12; 265-270.
- Blackman S., Obendorf R., Leopold A. (1995)**, „Desiccation tolerance in developing soybean seeds: the role of stress proteins“, *Physiologia Plantarum*, 93; 630-638.
- Bolte J., Demuyne C., Samaki H. (1987)**, „Transketolase catalyzed synthesis of ketoses“, *Tetrahedron Letters*, 28; 5525-5528.
- Bouvier F., d'Harlingue A., Suire C., Backhaus R. (1998)**, „Dedicated roles of plastid transketolases during the early onset of isoprenoid biogenesis in pepper fruits“, *Plant Physiology*, 117; 1423-1431.
- Bradford M. (1976)**, „A rapid and sensitive method for the quantitation of proteins utilizing the principle of protein-dye binding“, *Analytical Biochemistry*, 2; 248-254.
- Bray E. (1993)**, „Molecular responses to water deficit“, *Plant Physiology*, 103; 1035-1040.
- Bruni F., Leopold A. (1992)**, „Pools of water in anhydrobiotic organisms“, *Biophysiological Journal*, 63; 663-672.
- Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (2002)**, „Biochemistry and Molecular Biology of Plants.“, 1. Auflage, American Society of Plant Physiologists, Rockville.
- Buitink J., Hoekstra F., Leprince O. (2002)**, „Biochemistry and Biophysics of Tolerance Systems.“ In: „Desiccation and Survival in Plants: Drying Without Dying.“ Black M., Pritchard H. W. (Eds.), CABI Publishing,
<http://www.cabi-publishing.org/Bookshop/Readingroom/0851995349.asp>.
- Bull T., Glasziou K. (1963)**, „The evolutionary significance of sugar accumulation in *Saccharum*“, *Journal of Biology*, 16; 737-742.
- Burke M. (1986)**, „The glassy state and survival of anhydrous biological systems“ In: „Membranes, metabolism and dry organisms“, Leopold A. (Ed.), Cornell University Press, New York; 358-364.
- Bundesministerium für Umwelt NRW (2003)**, www.murl.nrw.de.
- Campbell N. (1997)**, „Biologie“, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Campbell S., Close T. (1997)**, „Dehydrins: genes, proteins, and associations with phenotypic traits.“, *New Phytologist*, 137; 61-74.

- Carpenter J., Crowe L., Crowe J. (1987a)**, „Stabilization of a phosphofructokinase with sugars during freeze-drying: characterization of enhanced protection in the presence of divalent cations.“, *Biochimica et Biophysica Acta*, 923; 109-115.
- Carpenter J., Martin B., Crowe L., Crowe J. (1987b)**, „Stabilization of phosphofructokinase during air-drying with sugars and sugar/transition metal mixtures.“, *Cryobiology*, 24; 455-464.
- Chandler J., Abrams S., Bartels D. (1997)**, „The effect of ABA analogs on callus viability and gene expression in *Craterostigma plantagineum*.“, *Physiologia Plantarum*, 99; 465-469.
- Chang B. , Beauvais R., Dong A., Carpenter J. (1996)**, „Physical factors affecting the storage stability of freeze-dried interleukin-1 receptor antagonist: glass transition and protein conformation.“, *Archives of Biological Chemistry*, 331; 249-258.
- Cellier F., Conéjéro G., Casse F. (2000)**, „Dehydrin transcript fluctuations during a day/night cycle in drought-stressed sunflower“., *Journal of Experimental Botany*, 51; 299-304.
- Clegg J. (2001)**, „Cryptobiosis - a peculiar state of biological organization“, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 128; 613-624.
- Close T. (1997)**, „Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature.“, *Physiologia Plantarum*, 100; 291-296.
- Crowe J., Crowe L., Chapman D. (1984)**, „Preservation of membranes in anhydrobiotic organism: the role of trehalose“, *Science*, 223; 701-703.
- Crowe J., Crowe L., Carpenter J., Wistrom C. (1987)**, „Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars“, *Biochemistry Journal*, 242; 1-10.
- Crowe J., Crowe L., Carpenter J., Rudolph A. (1988)**, „Interaction of sugars with membranes“, *Biochimica et Biophysica Acta*, 947; 367-384.
- Crowe J., Crowe L., Chapman D. (1992)**, „Anhydrobiosis“, *Annual Review of Physiology*, 54; 579-599.
- Cuming A. (1999)**, „LEA proteins“ In: „Seed proteins“, Shewry P., Casey R. (Eds.), Kluwer Academic Publishers, Netherlands; 753-780.
- Dalmas V., Demuynck C. (1993)**, „Study of the specificity of a spinach transketolase on achiral substrates“, *Tetrahedron Asymmetry*, 4; 2383-2388.
- Datta A., Racker E. (1961)**, „Mechanism of action of transketolase“, *Journal of Biological Chemistry*, 236; 617-623.

- Davis J. (1972)**, „Survival records in the algae and the survival role of certain algal pigments, fat and mucilaginous substances“, *Biologist*, 54; 52-93.
- Debnam P., Emes M. (1999)**, „Subcellular distribution of enzymes of the oxidative pentose phosphate pathway in root and in leaf issues“, *Journal of Experimental Botany*, 50; 1653-1661.
- Deng X., Phillips J., Meijer A., Salamini F., Bartels D. (2002)**, „Characterisation of five novel dehydration-responsive homeodomain leucin zipper genes from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*“, *Plant Molecular Biology*, 49; 601-610
- Deutscher Bauerverband (2003)**, www.bauernverband.de.
- Dische Z., Shettles L. (1948)**, „A specific color reaction for methyl pentoses and spectrophotometer micromethod for determination.“, *Journal of Biological Chemistry*, 175; 595-603.
- Drennan P., Smith M., Goldsworthy D., van Staden J. (1993)**, „The occurrence of trehalose in the leaves of the desiccation-tolerant angiosperm *Myrothamnus flabellifolius*“, *Journal of Plant Physiology*, 142; 493-496
- Dure L., Crouch M., Harada J., Ho T. (1989)**, „Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants“, *Plant Molecular Biology*, 12; 475-486.
- Dure L. (1993a)**, „Structural motifs in LEA proteins“ In: „Current Topics in Plant Physiology, Plant responses to cellular dehydration during environmental stress“, Close T., Bray E.(Eds), The American Society of Plant Physiologists, Rockville; 91-103.
- Dure L. (1993b)**, „A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation“, *The Plant Journal*, 3; 363-369.
- Eisermann, D. (1987)**, „Beiträge zur Chemie der Monosaccharide“, Dissertation Uni Oldenburg.
- Elster R. (1994)**, „Physiologische und molekulare Charakterisierung des Saccharosestoffwechsels der trocken-toleranten Wiederauferstehungspflanze *C. plantagineum* unter besonderer Berücksichtigung des Enzyms Saccharose Synthase [EC 2.4.1.13]“, Dissertation an der Universität zu Köln.
- Farrant J., Pammenter N., Berjak P. (1993)**, „Seed development in reaction to desiccation tolerance“, *Seed Science Research*, 3; 1-13.
- Feierabend J., Gringel G. (1983)**, „Plant transketolase: subcellular distribution search for multiple forms, site of synthesis“, *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 110; 247-258.
- Fiedler E., Golbik R., Schneider G. (2001)**, „Examination of donor substrate conversion in yeast transketolase“, *Journal of Biological Chemistry*, 276; 16051-16058.

- Fischer E. (1996)**, „Systematik der afrikanischen Linderniae“, Franz Steiner Verlag, Stuttgart.
- Flechner A., Dressen U., Westhoff P., Henze K. (1996)**, „Molecular characterization of transketolase [EC 2.2.1.1] active in the Calvin cycle of spinach chloroplasts“, *Plant Molecular Biology*, 32; 475-484.
- Frank W., Phillips J., Salamini F., Bartels D. (1998)**, „Two dehydration-inducible transcripts from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* encode interacting homeodomain-leucine zipper proteins.“, *The Plant Journal*, 15; 413-421.
- Frank W., Munnik T., Kerkmann K., Salamini F., Bartels D. (2000)**, „Water deficit triggers phospholipase D activity in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*.“, *Plant Cell*, 12; 111-124.
- Franks F. (1985)**, „Biophysics and Biochemistry at low temperatures“, Cambridge University Press Cambridge; 210-238.
- Gaff D. (1971)**, „Desiccation-tolerant flowering plants in Southern Africa“, *Science*, 174; 1033-1034.
- Gaff D. (1977)**, „Desiccation tolerant vascular plants of Southern Africa“, *Oecologia*, 31; 95-109.
- Gaff D. (1989)**, „Responses of desiccation tolerant resurrection plants to water stress“ In: „Structural and functional responses to environmental stresses.“, SPB Academic Publishing, Den Haag, Niederlande.
- Galau G., Hughes D. (1987)**, „Coordinate accumulation of homologous transcripts of seven cotton *lea* gene families during embryogenesis and germination.“, *Developmental Biology*, 123; 213-221.
- Galisnski E. (1993)**, „Compatible solutes of halophilic eubacteria: molecular principles, watersolute interaction, stress protection“, *Experimenta*, 49; 487-46.
- Gao X., Wang X., Lu Y., Zhang L., Shen Y., Liang Z., Zhang D. (2004)**, „Jasmonic acid is involved in the water-stress-induced betain accumulation in pear leaves“, *Plant Cell Environment*, 27; 497-512.
- Garg A., Kim J-K., Owens T., Ranwala A. (2002)**, „Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses“, *Applied Biological Science*, 99; 15898-15903.
- Goyal K., Tisi L., Basran A., Browne J., Burnell A., Zurdo J., Tunnacliffe A. (2003)**, „Transition from natively unfolded to folded state induced by desiccation in an anhydrobiotic nematode protein“, *Journal of Biological Chemistry*, 278; 12977-12984.

- Gerhardt S., Echt S., Busch M. (2003)**, „Structure and properties of an engineered transketolase from maize“, *Plant Physiology*, 132; 1941-1949.
- Green J., Angell C. (1989)**, „Phase relations and vitrification in saccharide-water solutions and the trehalose anomaly“, *Journal of Physiological Chemistry*, 93; 2880-2882.
- Guo N., Puhlev I., Brown D., Mansbridge J., Levine F. (2000)**, „Trehalose expression confers desiccation tolerance on human cells.“, *Nature Biotechnology*, 18; 168-171.
- Henkes S., Sonnewald U., Badur R., Flachmann R., Stitt M. (2001)**, „A small decrease of plastid transketolase activity in antisense tobacco transformants has dramatic effects on photosynthesis and phenylpropanoid metabolism“, *Plant Cell*, 13; 535-551.
- Hilbricht T., Salamini F. and Bartels D. (2002)**, „CpR18, a novel SAP-domain plant transcription factor, binds to a promoter region, necessary for ABA mediated expression of the *CDeT27-45* gene from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* Hochst.“, *The Plant Journal*, 31; 293-303.
- Hoekstra F., Crowe L., Crowe J. (1989)**, „Differential desiccation sensitivity of corn and *Pennisetum* pollen linked to their Saccharose content“, *Plant Cell Environment*, 12; 83-91.
- Howarth O., Pozzi N., Vlahov G., Bartels D. (1996)**, „NMR structural analysis of a tri-O-isopropylidene derivative of 2-D-glycero-D-ido-octulose the major sugar found in the resurrection plant *C. plantagineum*“, *Carbohydrate Research*, 289; 137-142.
- Hsaio T. (1973)**, „Plant responses to water stress“, *Annual Review of Plant Physiology*, 24; 519-570.
- Ingram J., Bartels D. (1996)**, „The molecular basis of desiccation tolerance in plants.“, *Annual Review of Plant Physiology*, 47; 377-403.
- Ingram J., Chandler J., Gallagher L., Salamini F., Bartels D. (1997)**, „Analysis of cDNA clones encoding Saccharose-phosphate synthase in relation to sugar interconversions associated with dehydration in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* Hochst.“, *Plant Physiology*, 115; 113-121.
- Irvine R., Flanigan I., MacLeod J. (1992)**, „Mass spectrometric studies of the path of carbon in photosynthesis: positional isotopic analysis of ¹³C labelled 2-octulose phosphates“, *Organic Mass Spectrometry*, 27; 1052-1060 .
- Isherwood F., Barrett F. (1967)**, „Analysis of Phosphate Esters in Plant Material“, *Biochemical Journal*, 14; 922-932.

- Iturriaga G., Schneider K., Salamini F., Bartels D. (1992)**, „Expression of desiccation related proteins from the resurrection plant *C. plantagineum* in transgenic tobacco“, *Plant Molecular Biology*, 20; 555-558.
- Jonak C., Ökrész L., Bögre L., Hirt H. (2002)**, „Complexity, Cross Talk and Integration of Plant MAP Kinase Signalling.“, *Current Opinion in Plant Biology*, 5; 415-424.
- Kaczmarek M., Nion P. (1983)**, „Variants of transketolase from human erythrocytes“, *Clinica Chimica Acta*, 130; 349-356.
- Kaiser K. (1985)**, „Sugar contents of leaves of desiccation-sensitive and desiccation-tolerant plants“, *Naturwissenschaften*, 72; 608-609.
- Kappen L., Valladares F. (1999)**, „Opportunistic growth and desiccation tolerance: the ecological success of poikilohydrous autotrophs.“ In: „Handbook of Functional Plant Ecology“, Pugnaire F. Valladares F. (Eds.), Marcel Dekker, New York, 10-80.
- Kapuscinski, M., Franke F., Flanigan I., MacLeod J., Williams J. (1985)**, „Improved methods for the enzymatic preparation and chromatography of octulose phosphates“, *Carbohydrate Research*, 140; 69-79.
- Kirch, H., Nair A., Bartels D. (2001)**, „Novel ABA- and dehydration-inducible aldehyde dehydrogenase genes isolated from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* and *Arabidopsis thaliana*.“, *The Plant Journal*, 28; 1-15.
- Kiyosue T, Yoshiba Y., Yamaguchi-Shinozaki K. and Shinozaki K. (1996)**, „A Nuclear Gene Encoding Mitochondrial Proline Dehydrogenase, an Enzyme Involved in Proline Metabolism, Is Upregulated by Proline but Downregulated by Dehydration in *Arabidopsis*.“, *Plant Cell*, 8; 1323-1335.
- Kleines M., Elster R., Rodrigo M., Blervacq A., Salamini F., Bartels D. (1999)**, „Isolation and expression analysis of two stress-responsive Saccharose-synthase genes from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* Hochst.“, *Planta*, 209; 13-24.
- Kobori Y., Myles D., Whitesides G. (1992)**, „Substrate specificity and carbohydrate synthesis using transketolase“, *Journal of Organic Chemistry*, 57; 5899-5907.
- Kochetov G. (1982)**, „Transketolase from yeast, rat liver and pig liver“, *Methodes of Enzymology*, 90; 209-223.
- Kohn L., Warren W. (1970)**, „The kinetic properties of spinach leaf glyoxylic acid reductase“, *Journal of Biological Chemistry*, 245; 3831-3839.
- Koster K. (1991)**, „Glass formation and desiccation tolerance in seeds“, *Plant Physiology*, 96; 302-304.
- Kramer P. (1983)**, „Water relations of plants“, Academic Press Inc., Orlando.

- Krishna R., Wold F. (1993)**, „Post translational modifications of proteins“, *Advances in Enzymology*, 67; 265-285.
- Laemmli U. (1970)**, „Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4“, *Nature*, 227; 681-685.
- Lehmann J. (1976)**, „Chemie der Kohlenhydrate-Monosaccharide und Derivate“, Thieme-Verlag, Stuttgart
- Leprince O., Colson P., Houssier C., Deltour R. (1995)**, „Changes in chromatin structure associated with germination of maize and their relation with desiccation tolerance.“, *Plant Cell Environment*, 18; 619-629.
- Libbert E. (1993)**, „Lehrbuch der Pflanzenphysiologie“, Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Lin T., Huang N. (1994)**, „The relationship between carbohydrate composition of some tree seeds and their longevity“, *Journal of Experimental Botany*, 45; 1289-1294.
- Lindqvist Y., Schneider G., Ermler U. (1992)**, „Three-dimensional structure of transketolase, a thiamine diphosphate dependent enzyme, at 2,5 Å resolution“, *EMBO Journal*, 11; 2373-2379.
- Madin K., Crowe, J. (1975)**, „Anhydrobiosis in nematodes: carbohydrate and lipid metabolism during dehydration“, *Journal of Experimental Zoology*, 193; 335-342.
- Mazur P. (1968)**, „Survival of fungi after freezing and desiccation.“ In: „The Fungi.“, Ainsworth G., Sussman A. (Eds.), Academic Press, London; 325-394.
- McElfresh K., Chourey P. (1988)**, „Anaerobiosis induces transcription but not translation of Saccharose synthase in maize“, *Plant Physiology*, 87; 542-546.
- Mittler R., Zilinskas B. (1994)**, „Regulation of pea cytosolic ascorbate peroxidase and other antioxidant enzymes during the progression of drought stress and following recovery from drought“, *The Plant Journal*, 5; 397-405.
- Munnik T., de Vrije T., Irvine R., Musgrave A. (1996)**, „Identification of Diacylglycerol Pyrophosphate as a Novel Metabolic Product of Phosphatic Acid during G-Protein-Activation in Plants.“, *Journal of Biological Chemistry*, 271; 15708-15715.
- Munnik T., Meijer H., Ried B., Hirt H., Frank W., Bartels D., Musgrave A. (2000)**, „Hyperosmotic stress stimulates phospholipase D activity and elevates the levels of phosphatic acid and diacylglycerol pyrophosphate.“, *The Plant Journal*, 22; 147-154.
- Nilsson U., Meshalkina L., Lindqvist Y., Schneider G. (1997)**, "Examination of substrate binding in thiamin diphosphate-dependent transketolase by protein crystallography and site-directed mutagenesis", *Journal of Biological Chemistry*, 272; 1864-1869.

- Norwood M., Truesdale M., Richter A., Scott P. (2000)**, "Photosynthetic carbohydrate metabolism in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*", *Journal of Experimental Botany*, 51; 159-165.
- Norwood M., Tolde O., Richter A., Scott P. (2003)**, „Investigation into the ability of roots of the poikilohydric plant *Craterostigma plantagineum* to survive dehydration stress“, *Journal of Experimental Botany*, 54; 2313-2321.
- Oliver M., Woods A., O'Mahony P. (1998)**, „To dryness and beyond-preparation for the dried state and rehydration in vegetative desiccation-tolerant plants“, *Plant Growth Regulation*, 24; 193–210.
- Oliver M., Tuba Z., Mishler B. (2000)**, „The evolution of vegetative desiccation tolerance in land plant“, *Plant Ecology*, 151; 85-100.
- Paoletti F., Aldinucci D. (1986)**, „Immunoaffinity purification of rat liver transketolase: evidence for multiple forms of the enzyme“, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 245; 212-219.
- Paoletti F., Williams J., Horecker B. (1979)**, „Detection and estimation of sedoheptulose and octulose mono- and bisphosphates in extracts of rat liver“, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 198; 620-626
- Phillips J., Oliver M., Bartels D. (2002a)**, „Molecular Genetics of Desiccation and Tolerant Systems.“ In: „Desiccation and Survival in Plants: Drying Without Dying.“, Black M., Pritchard H. (Eds.) CABI Publishing,
http://www.cabi-publishing.org/Bookshop/Readingroom/08519953_49.asp.
- Phillips J., Hilbricht T., Salamini F., Bartels D. (2002b)**, „A novel abscisic acid- and dehydration-responsive gene family from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* encodes a plastid-targeted protein with DNA-binding activity.“, *Planta*, 215; 258-266.
- Piatkowski D., Schneider K., Salamini F., Bartels D. (1990)**, „Characterization of five abscisic acid-responsive cDNA clones isolated from the desiccation-tolerant plant *Craterostigma plantagineum* and their relationship to other water-stress genes.“, *Plant Physiology*, 94; 1682-1688.
- Porembski S., Barthlott W. (2000)**, „Granitic and gneissic outcrops (inselbergs) as center of diversity for desiccation-tolerant vascular plants.“, *Plant Ecology*, 151; 19-28.
- Potts M. (1994)**, „Desiccation tolerance of prokaryotes“, *Microbiological Reviews*, 58; 755-805.

- Potts M. (1999)**, „Mechanisms of desiccation tolerance in cyanobacteria.“, *European Journal of Phycology*, 57; 43-68.
- Prestrelski S., Tedeschi N., Arakawa T. and Carpenter J. (1993)**, „Dehydration-induced conformational transitions in proteins and their inhibition by stabilizers.“, *Biophysical Journal*, 65; 661-671.
- Proctor M., Pence V. (2002)**, „Vegetative Tissues: Bryophytes, Vascular Resurrection Plants and Vegetative Propagules.“ In: „Desiccation and Survival in Plants: Drying Without Dying.“ Black M., Pritchard H. (Eds.) CABI Publishing, <http://www.cabi-publishing.org/Bookshop/Readingroom/0851995349.asp>.
- Rahmanzadeh R. (2002)**, “Molekulare Untersuchungen ausgewählter Linderniae unter dem Aspekt der Trockentoleranz“, Diplomarbeit an der Universität zu Bonn.
- Ramanjulu S., Bartels D. (2002)**, „Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants.“, *Plant Cell Environment*, 25; 141-151.
- Reid D. M. (1991)**, „Drought stress“ In: *Plant Physiology*, Vol. 10: „Growth and development“, Steward F. (Ed.); 136-160.
- Richardson D. (1981)**, „The biology of mosses.“, Blackwell Scientific, New York.
- Richter G. (1988)**, „Stoffwechselfysiologie der Pflanzen“, Thieme Verlag, Stuttgart.
- Richter G. (1996)**, „Biochemie der Pflanzen“, Thieme Verlag, Stuttgart.
- Sales K., Brandt W., Rumbak E., Lindsay G. (2000)**, „The Lea-like protein HSP 12 in *Saccharomyces cerevisiae* has a plasma membrane location and protects membranes against desiccation and ethanol-induced stress.“, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1463; 267-278.
- Salinovich O., Montelaro R. (1986)**, „Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfatepolyacrylamide gel electrophoresis“, *Analytical Biochemistry*, 156; 341-347.
- Schaaff-Gerstenschläger I., Mannhaupt G., Vetter I., Zimmermann F., Feldmann H. (1993)**, „Tkt2, a second transketolase gene of *S. cerevisiae*: cloning sequence and deletion analysis of the gene“, *European Journal of Biochemistry*, 217; 487-492; Erratum in: *European Journal of Biochemistry* (1994), 219; 1087.
- Schenk G., Duggleby R., Nixon P. (1998)**, „Properties and function of the thiamin diphosphate depend enzyme transketolase“, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 30; 1297-1318.

- Schnarrenberger C., Flechner A., Martin W. (1995)**, „Enzymatic evidence for a complete oxidative pentosephosphate pathway in chloroplasts and an incomplete pathway in the cytosol of spinach leaves“, *Plant Physiology*, 108; 609-614.
- Schneider G., Lindqvist Y. (1998)**, „Crystallography and mutagenesis of transketolase mechanistic implications for enzymatic thiamin catalysis“, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1385; 387-398.
- Schopfer P. und Brennicke A. (1999)**, „Pflanzenphysiologie“, 5. Auflage, Springer Verlag, Heidelberg.
- Schwab K., Gaff D. (1986)**, „Sugar and ion content in leaf tissues of several drought tolerant plants under water stress“, *Journal of Plant Physiology*, 125; 257-265.
- Schwab K., Schreiber U., Heber U. (1989)**, „Response of photosynthesis and respiration of resurrection plants under water stress“, *Planta*, 177; 217-227.
- Schwall G. (1995)**, „Molekulare und biochemische Charakterisierung des Enzyms Transketolase aus der Wiederauferstehungspflanze *C. plantagineum*“, Dissertation, Universität zu Köln.
- Schwall G., Elster R., Ingram J., Bernacchia G., Bianchi G., Gallagher L., Salamini F., Bartels D. (1996)**, „Carbohydrate metabolism in the desiccation tolerant *plant Craterostigma plantagineum*.“ In: „Sucrose metabolism, Biochemistry and molecular biology“, Pontis H., Salerno G., Echeverria E. (Eds.), *American Society of Plant Physiologists*, 14; 245-253
- Smirnoff N. (1993)**, „The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation.“, *New Phytologist*, 125; 27-58.
- Smythe B. (1967)**, „Saccharose crystal growth“, *Journal of Chemistry*, 20; 1097-1114.
- Sprenger G., Schörken U., Sprenger G., Sahn H. (1995)** „Transketolase A of *E. coli* K12-purification and properties of the enzyme from recombinant strains“, *European Journal of Biochemistry*, 230; 525-532.
- Soulages J., Kim K., Arrese E., Walters C., Cushman C. (2003)**, „Conformation of a Group 2 Late Embryogenesis Abundant Protein from Soybean. Evidence of Poly (L-Proline)-type II Structure“, *Plant Physiology*, 131; 963-975.
- Sturm A., Tang G. (1999)**, „The Saccharose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbonpartitioning“, *Trends in plant science*, 4; 401-407.
- Strasburger (2002)**, „Lehrbuch der Botanik“, 35. Aufl., Spektrum Lehrbuch, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Stryer L. (1996)**, „Biochemie“, Spektrum Akademischer Verlag GMBH, Heidelberg.

- Svergun D., Petoukhov M., Koch M., König S. (2000)**, „Crystal versus solution structures of thiamine diphosphate-dependent enzymes“, *Journal of Biological Chemistry*, 275; 297-302.
- Tabaei-Aghdaei S., Harrison P., Pearce R. (2000)**, „Expression of dehydration-stress-related genes in the crowns of wheatgrass species [*Lophopyrum elongatum* (Host.) A. Love and *Agropyron desertorum* (Fisch. ex Link.) Schult.] having contrasting acclimation to salt, cold and drought.“, *Plant Cell Environment*, 23; 561-571.
- UNESCO (2003)** Weltwasserentwicklungsbericht der Vereinten Nationen. UNO-Verlag Bonn, www.unesco.org/water/wwap.
- Velasco R., Salamini F., Bartels D. (1994)**, „Dehydration and ABA increase mRNA levels and enzyme activity of cytosolic GAPDH in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*.“, *Plant Molecular Biology*, 26; 541-546.
- Walters C., Farrant J., Pammenter N., Berjak P. (2002)**, “Desiccation Stress and Damage.” In: „Desiccation and Survival in Plants: Drying Without Dying.“, Black M., Pritchard H. (Eds.), CABI Publishing,
<http://www.cabi-publishing.org/Bookshop/Readingroom/0851995349.asp>.
- Winter H., Huber J., Huber S. (1997)**, „Membrane association of Saccharose synthase: changes during the graviresponse and possible control by protein phosphorylation“, *FEBS Letters*, 430; 151-155.
- Wolkerts W., McCready S., Brandt W., Lindsay G., Hoekstra F. (2000)**, „Isolation and characterization of a D-7 LEA protein from pollen that stabilizes glasses *in vitro*.“, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1544; 196-206.
- Wood T. (1968)**, „The detection and identification of intermediates of the pentose phosphate cycle and related compounds“, *Journal of Chromatography*, 35; 352-361.
- Wood T. (1981)**, „The preparation of transketolase free from D-ribose-5-phosphate-3-epimerase“, *Biochimica et Biophysica Acta*, 659; 233-243.
- Wood T. (1985)**, „The pentose-phosphate pathway“, Academic Press, Orlando.
- Wrzaczek M., Hirt H. (2001)**, „Plant MAP kinase pathways: how many and what for?“, *Biology of the Cell*, 93; 81-87.
- Yokota A., Kawasaki S., Iwano M., Nakamura C. (2002)**, „Citrulline and DRIP-1 protein in drought tolerance of wild watermelon“, *Annals of Botany*, 89; 825-832.
- Yoshimura K., Yabuta Y., Ishikawa T., Shigeoka S. (2000)**, „Expression of Spinach Ascorbate Peroxidase Isoenzymes in Response to Oxidative Stresses“, *Plant Physiology*, 123; 223–234.

Zehr B., Savin T., Hall R. (1989), „A one Step low background Coomassie staining procedure for polyacrylamide gels“, *Analytical Biochemistry*, 182; 157-159.

Zhao G., Winkler M. (1994), „An *E. coli* K-12 tktA tktB mutant deficient in transketolase activity requires pyridoxine (vitamin B6) as well as the aromatic amino acids and vitamins for growth“, *Journal of Bacteriology*, 176; 6134-6138.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Prof. Dr. Dorothea Bartels danken, die es mir ermöglicht hat, diese Arbeit anzufertigen und mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Bei Prof. Dr. Lukas Schreiber möchte ich mich sehr für die Übernahme des Koreferats und die Bereitstellung der GC/FID- und GC/MS-Apparaturen bedanken. Darüber hinaus danke ich ihm für die netten und informativen Diskussionen.

Ich möchte mich auch besonders bei Prof. Dr. Arnold Schwartz für die Bereitstellung von dringend benötigten Materialien, seiner Hilfestellung bei auftretenden Problemen und die netten Gespräche bedanken.

Mein weiterer Dank gilt Dr. Benny Rochus Franke für seine Einweisungen an den GC-Apparaturen, seine Unterstützung und seine Tips.

Bernd Gehrig möchte ich für die Bereitstellung der FPLC- und HPLC-Anlage danken und Dipl. Chem. Michael Arendt für die Vertiefung meines Wissens über 2D-Gelelektrophorese. Beiden danke ich darüber hinaus für informative und nette Diskussionen, die auch mal bis in den Abend hinein dauerten.

Meinem Freund LM-Chemiker Oliver Schmidt danke ich für die Hilfe bei der 2D-Gelelektrophorese und die Unterkunft während meiner Zeit in Münster, und besonders danke ich ihm für seine Freundschaft.

Bei Dr. Simone König, ebenfalls aus Münster, möchte ich mich für die Hilfe bei den MALDI TOF-MS-Auswertungen ganz herzlich bedanken.

Ich möchte auch gerne diejenigen erwähnen, die bisher noch ungenannt blieben, aber im Laufe der Zeit sehr dazu beigetragen haben, dass mir meine Arbeit Spaß gemacht hat. Dies waren insbesondere Ellinor Hertweck, Birgit Walldorf, Stefanie Smolny, Horst Röhrig, Tanja Marwedel, Hans-Hubert Kirch, Ursula Krimm, Simeon Oloni Kotchoni, Andrea Ditzer, Simone Schlingensiepen, Ramtin Rahmzadeh und Mareike Schulz.

Meinen Eltern danke ich für ihre Unterstützung in allen Lebenslagen sehr herzlich. Sie haben mir immer geholfen, wenn Not am Mann war. Danke.

Last but not least gebührt besonderer Dank meiner Frau Cara, die mir immer zur Seite stand, meine Launen ertragen hat und mir immer seelischen Beistand leistete, wenn ich ihn brauchte. Nicht zu vergessen, danke ich ihr natürlich auch für die Durchsicht des Manuskriptes!

